

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARLOS EDUARDO PIEMONTEZ MADURO

Óleos Essenciais de Quatro Espécies Nativas de *Piper*: *Piper caldense* C. DC., *P. solmsianum* C. DC., *P. umbellatum* L. e *P. xylosteoides* Kunth

CURITIBA

2019

CARLOS EDUARDO PIEMONTEZ MADURO

Óleos Essenciais de Quatro Espécies Nativas de *Piper*: *Piper caldense* C. DC., *P. solmsianum* C. DC., *P. umbellatum* L. e *P. xylosteoides* Kunth

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química – UFPR, do Setor de Ciências Exatas na Universidade Federal do Paraná – UFPR.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Beatriz Helena L. de N. Sales Maia

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

M138o Maduro, Carlos Eduardo Piemontez

Óleos essenciais de quatro espécies nativas de *Piper*: *Piper caldense* C. DC., *P. solmsianum* C. DC., *P. umbellatum* L. e *P. xylosteoides* Kunth [recurso eletrônico] / Carlos Eduardo Piemontez Maduro — Curitiba, 2019.

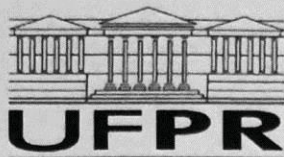
Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química.

Orientadora: Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia

1. Essências e óleos essenciais. 2. Atividade antimicrobiana. I. Universidade Federal do Paraná. II. Maia, Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales. III. Título.

CDD: 547.71

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **CARLOS EDUARDO PIEMONTEZ MADURO** intitulada: **Óleos Essenciais de Quatro Espécies Nativas de Piper: *Piper caldense* C. DC., *P. solmsianum* C. DC., *P. umbellatum* L. e *P. xylosteoides* Kunth**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Março de 2019.

BEATRIZ HELENA LAMEIRO DE NORONHA SALES MAIA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

CLAUDINEY SOARES CORDEIRO

Avaliador Interno (UFPR)

IEDA MARIA BEGNINI

Avaliador Externo (FURB)

Dedico este trabalho aos meus pais, Antonio Pereira Maduro e Maria Lucia Piemontez Maduro, e à minha amada esposa, Letícia Gonçalves Maduro, por todo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antonio Pereira Maduro e Maria Lucia Piemontez Maduro, e aos meus irmãos, Marco Aurélio Piemontez Maduro e Paulo Antonio Piemontez Maduro, pelo apoio, incentivo e por sempre estarem presentes ou em forma de pensamentos.

À minha amada esposa Letícia Gonçalves Maduro, pelo amor, incentivos, ajuda, paciência e carinho constantes.

À Prof^a. Dr^a. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia pela orientação, pelo apoio e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Dr. Wanderlei do Amaral e ao Prof. Dr. Diones Krinski (UNEMAT) pelas coletas do material vegetal.

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi, à Prof.^a Dr.^a Cristina Gonçalves de Mendonça e ao Prof. Dr. Bruno Portela Brasileiro por permitirem a minha liberação do horário de trabalho para minha dedicação ao mestrado.

Ao Prof. Dr. Cícero Deschamps por ceder a estrutura do Laboratório de Ecofisiologia (UFPR) para extração dos óleos essenciais.

Ao Técnico Mestre Roger Raupp Cipriano pelo auxílio e ensinamentos nas extrações dos óleos essenciais.

À Dr^a. Marta Cristina Teixeira Duarte do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (UNICAMP) pela realização dos ensaios antimicrobianos.

Aos professores Dr. Ana Luisa Lacava Lordello, Dr. Claudiney Soares Cordeiro por todas as contribuições neste trabalho, realizadas através da banca de qualificação.

À professora membro externo da banca, Dr^a. Iêda Maria Begnini e Dr. Claudiney Soares Cordeiro, pela disponibilidade em contribuir e avaliar este trabalho.

Aos professores do departamento de Química que com esforço e dedicação deram suas aulas na qual participei e com seus ensinamentos pude aprimorar mais meus conhecimentos.

À mãe Vilza Helena Amaral Pontes, às minhas irmãs e irmãos do TEUSOL e aos meus amigos da vida, por todos os pensamentos que emanaram neste período de pesquisas e aprendizados.

Aos meus amigos do LAPNEQ por toda atenção e carinho em me ajudar e me orientar desde a minha chegada ao laboratório.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR pela infraestrutura e oportunidade para a realização desta pesquisa.

“Faça. Ou não faça. Não existe a tentativa.”

Mestre Yoda

RESUMO

O gênero *Piper* possui 292 espécies produtoras de óleos essenciais distribuídas pela Amazônia brasileira e Mata Atlântica. Neste trabalho, foi determinada a composição química dos óleos essenciais em função da sazonalidade das folhas frescas e secas das espécies de *Piper caldense* C. DC. e *Piper xylosteoides* Kunth coletadas na cidade de Cerro Azul (PR), *Piper solmsianum* C. DC. e *Piper umbellatum* L. coletadas na cidade de Tapiraí (SP). Ao todo foram identificados 32 compostos para *P. caldense*, 27 para *P. xylosteoides*, 21 para *P. solmsianum* e 8 para *P. umbellatum* através das análises por Cromatografia em fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) e pelo Índice Aritmético (IA), sendo as principais classes observadas, a dos hidrocarbonetos monoterpênicos, hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpenos oxigenados. Os constituintes majoritários encontrados nos óleos essenciais de *P. caldense* foram δ -cadineno (12%), *E*-cariofileno (10%), germacreno D (9%), biciclogermacreno (8%), α -cadinol (6%); para *P. xylosteoides* β -felandreno (20%), (*E*)-nerolidol (12%), biciclogermacreno (11%), *E*-cariofileno (7%) e δ -elemeno (7%); para *P. solmsianum* biciclogermacreno (21%), germacreno D (19%), α -pineno (11%), δ -cadineno (8%), α -copaeno (6%) e epi-cubebol (6%) e para *P. umbellatum* γ -muuroleno (67%), biciclogermacreno (11%) e (*E*)-cariofileno (10%). Para cada espécie verificou-se, através da Análise de Componentes Principais (ACP), diferenças e semelhanças entre as amostras de folhas frescas e secas das quatro espécies de *Piper* estudadas. As análises antimicrobianas mostraram que os óleos essenciais das espécies de *Piper* foram mais ativos para os microrganismos *B. subtilis*, *S. aureus* e *E. coli*. Para os 2 últimos, a *P. xylosteoides* não apresentou atividade, porém foi a única espécie que apresentou inibição para a *C. albicans*.

Palavras-chave: *Piper caldense*, *Piper solmsianum*, *Piper umbellatum*, *Piper xylosteoides*. Óleo essencial. Variação sazonal. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The *Piper* genus has 292 essential oil producing species distributed throughout the Brazilian Amazon and Atlantic Forest. In this work, the chemical composition of the essential oils was determined as a function of the seasonality of the fresh and dry leaves of the species of *Piper caldense* C. DC. and *Piper xylosteoides* Kunth collected in the city of Cerro Azul (PR), *Piper solmsianum* C. DC. and *Piper umbellatum* L. collected in the city of Tapiraí (SP). A total of 32 compounds were identified for *P. caldense*, 27 for *P. xylosteoides*, 21 for *P. solmsianum* and 8 for *P. umbellatum* by Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) and the Arithmetic Index (AI), with the main classes observed being that of monoterpenes hydrocarbons, sesquiterpenes hydrocarbons and oxygenated sesquiterpenes. The major constituents found in the essential oils of *P. caldense* were δ -cadinene (12%), *E*-caryophyllene (10%), germacrene D (9%), bicyclogermacrene (8%), α -cadinol (6%); for *P. xylosteoides* β -felandrene (20%), (*E*)-etherolidol (12%), bicyclogermacrene (11%), *E*-caryophyllene (7%) and δ -elemene (7%); for *P. solmsianum* bicyclogermacrene (21%), germacrene D (19%), α -pinene (11%), δ -cadinene (8%), α -copaene (6%) and *epi*-cubebol *P. umbellatum* γ -muurolene (67%), bicyclogermacrene (11%) and (*E*)-caryophyllene (10%). For each species, it was verified, through the Principal Component Analysis (PCA), differences and similarities between the samples of fresh and dry leaves of the four *Piper* species studied. The antimicrobial analyzes showed that the essential oils of the *Piper* species were more active for the *B. subtilis*, *S. aureus* and *E. coli* microorganisms. For the last two, *P. xylosteoides* showed no activity, but it was the only species that presented inhibition for *C. albicans*.

Key words: *Piper caldense*, *Piper solmsianum*, *Piper umbellatum*, *Piper xylosteoides*. Essential oil. Seasonal variation. Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via do Mevalonato (MVA).	16
Figura 2. Via do Metil Eritritol Fosfato (MEP).	17
Figura 3. Estrutura do isopreno (2-metil-1,3-butadieno).	18
Figura 4. Síntese dos Terpenos.	18
Figura 5. Principais classes de monoterpenos.	19
Figura 6. Principais classes de sesquiterpenos.	20
Figura 7. Compostos majoritários dos óleos essenciais das folhas frescas de <i>P. caldensen</i> as quatro estações do ano.	33
Figura 8. Compostos majoritários dos óleos essenciais das folhas secas de <i>P. caldense</i> nas quatro estações do ano.	37
Figura 9. Scores obtidos com a média das triplicatas dos óleos essenciais das folhas frescas e secas de <i>Piper caldense</i> coletadas nas quatro estações do ano (A – Inverno fresca. B – Primavera fresca. C – Verão fresca. D – Outono fresca. E - Inverno seca. F – Primavera seca. G – Verão seca. H – Outono seca).	41
Figura 10. Loadings obtido com a média das triplicatas dos óleos essenciais das folhas frescas e secas de <i>Piper caldense</i> coletadas nas quatro estações do ano.	42
Figura 11. Compostos majoritários dos óleos essenciais das folhas frescas de <i>P. solmsianum</i> nas quatro estações do ano.	43
Figura 12. Scores obtidos com a média das triplicatas dos óleos essenciais das folhas frescas e secas de <i>Piper solmsianum</i> coletadas nas quatro estações do ano (A – Inverno fresca. B – Primavera fresca. C – Verão fresca. D – Outono fresca. E - Inverno seca. F – Primavera seca. G – Verão seca. H – Outono seca).	48
Figura 13. Loadings obtido com a média das triplicatas dos óleos essenciais das folhas frescas e secas de <i>Piper solmsianum</i> coletadas nas quatro estações do ano.	49
Figura 14. Compostos majoritários dos óleos essenciais das folhas secas de <i>P. umbellatum</i> nas quatro estações do ano.	50
Figura 15. Scores obtidos com a média das triplicatas dos óleos essenciais das folhas frescas e secas de <i>Piper umbellatum</i> coletadas nas quatro estações do ano (A – Inverno fresca. B – Primavera fresca. C – Verão fresca. D – Outono fresca. E - Inverno seca. F – Primavera seca. G – Verão seca. H – Outono seca).	54
Figura 16. Loadings obtido com a média das triplicatas dos óleos essenciais das folhas frescas e secas de <i>Piper umbellatum</i> coletadas nas quatro estações do ano.	55
Figura 17. Compostos majoritários dos óleos essenciais das folhas frescas de <i>P. xylosteoides</i> nas quatro estações do ano.	57
Figura 18. Scores obtidos com as médias dos óleos essenciais das folhas frescas e secas de <i>Piper xylosteoides</i> coletadas nas quatro estações do ano (A – Inverno fresca. B – Primavera fresca. C – Verão fresca. D – Outono fresca. E - Inverno seca. F – Primavera seca. G – Verão seca. H – Outono seca).	62
Figura 19. Loadings obtido com a média das triplicatas dos óleos essenciais das folhas frescas e secas de <i>Piper xylosteoides</i> coletadas nas quatro estações do ano.	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas frescas de <i>Piper caldense</i> em relação às estações do ano.	36
Gráfico 2. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas secas de <i>Piper caldense</i> em relação às estações do ano.	39
Gráfico 3. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas frescas e secas de <i>Piper caldense</i> em relação às estações do ano.	40
Gráfico 4. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas frescas de <i>Piper solmsianum</i> em relação às estações do ano.	45
Gráfico 5. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas secas de <i>Piper solmsianum</i> em relação às estações do ano.	47
Gráfico 6. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas frescas e secas de <i>Piper solmsianum</i> em relação às estações do ano.	48
Gráfico 7. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas frescas de <i>Piper umbellatum</i> em relação às estações do ano.	51
Gráfico 8. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas secas de <i>Piper umbellatum</i> em relação às estações do ano.	52
Gráfico 9. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas frescas e secas de <i>Piper umbellatum</i> em relação às estações do ano.	53
Gráfico 10. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas frescas de <i>Piper xylosteoides</i> em relação às estações do ano.	57
Gráfico 11. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas secas de <i>Piper xylosteoides</i> em relação às estações do ano.	60
Gráfico 12. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas frescas e secas de <i>Piper xylosteoides</i> em relação às estações do ano.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Extrações e rendimentos dos óleos essenciais das quatro espécies de <i>Piper</i>	32
Tabela 2. Principais constituintes identificados nos óleos essenciais das folhas frescas de <i>Piper caldensen</i> nas quatro estações do ano.	35
Tabela 3. Principais constituintes identificados nos óleos essenciais das folhas secas de <i>Piper caldense</i> nas quatro estações do ano.	38
Tabela 4. Principais constituintes identificados nos óleos essenciais das folhas frescas de <i>Piper solmsianum</i> nas quatro estações do ano.	44
Tabela 5. Principais constituintes identificados nos óleos essenciais das folhas secas de <i>Piper solmsianum</i> nas quatro estações do ano.	46
Tabela 6. Principais constituintes identificados nos óleos essenciais das folhas frescas de <i>Piper umbellatum</i> nas quatro estações do ano.	50
Tabela 7. Principais constituintes identificados nos óleos essenciais das folhas secas de <i>Piper umbellatum</i> nas quatro estações do ano.	52
Tabela 8. Principais constituintes identificados nos óleos essenciais das folhas frescas de <i>Piper xylosteoides</i> nas quatro estações do ano.....	56
Tabela 9. Principais constituintes identificados nos óleos essenciais das folhas secas de <i>Piper xylosteoides</i> nas quatro estações do ano.....	59
Tabela 10. Atividades antimicrobianas (concentração mínima inibitória - CMI) dos óleos essenciais das quatro espécies de <i>Piper</i>	64
Tabela 11. Atividades antimicrobianas (concentração mínima bactericida - CMB) dos óleos essenciais das quatro espécies de <i>Piper</i>	64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Terpenoides.....	15
1.1.1. Via do Mevalonato (MVA)	15
1.1.2. Via do Metil Eritritol Fosfato (MEP)	16
1.1.3. Formação dos Terpenos.....	17
1.2. Família Piperaceae	20
1.2.1. <i>Piper caldense</i> C. DC.	22
1.2.2. <i>Piper solmsianum</i> C. DC.	23
1.2.3. <i>Piper umbellatum</i> L.....	24
1.2.4. <i>Piper xylosteoides</i> Kunth	25
1.3. Quimiometria.....	26
2. OBJETIVOS	28
2.1. Gerais	28
2.2. Específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1. Materiais	28
3.2. Coleta e identificação do material botânico	28
3.3. Preparação do material botânico	29
3.4. Extração e identificação dos óleos essenciais	29
3.5. Tratamento estatístico.....	30
3.6. Atividade antimicrobiana	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 <i>Piper caldense</i> C. DC.	33
4.2 <i>Piper solmsianum</i> C. DC.	42
4.3 <i>Piper umbellatum</i> L.....	50
4.4 <i>Piper xylosteoides</i> Kunth	55
4.5. Atividade antimicrobiana	63
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	67
6. REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO

Muito empregados na medicina e na cosmética, os óleos essenciais eram utilizados desde tempos remotos em civilizações antigas como a chinesa e a egípcia, porém não existe um documento que contenha um provável início de sua utilização (VASCONCELOS, 2017). Em algumas lendas sobre o uso de essências sobre ervas, encontra-se o livro “Shen Nung Pen Tsao Ching” do ano de 2500 a.C. escrito por Shen Nung considerado o fundador da medicina herbária chinesa (GUILHERME, 2017) e no ano de 2000 a.C. em livros escritos em sânscrito pelo povo hindu.

Na década de 80 houve um grande aumento das terapias medicinais alternativas introduzindo outros sistemas como a tradicional chinesa, a Ayurvédica, homeopáticas e as populares como as Xamânicas ou ligadas às religiões afro descendentes ou indígenas nos países latinos americanos que utilizam as ervas medicinais como forma de cura e energização para problemas físicos ou energéticos. Houve uma grande aceitação por parte da população por causa das características da utilização de diferentes concentrações e tipos de óleos essenciais nos tratamentos específicos dos pacientes de acordo com a especificidade de cada consulta com o terapeuta dada à devida atenção e escuta individualizada (MACHADO e FERNANDES, 2011; LUZ, 2005).

A resistência adquirida de microrganismos patogênicos como bactérias e fungos, aos vários medicamentos encontrados no mercado atual e a susceptibilidade de atuação em numerosos meios, com diferentes temperaturas e outras condições, tem levado à procura de alternativas de novos remédios, incentivando pesquisas por antibióticos naturais a partir de plantas medicinais (SARTO e ZANUSSO JUNIOR, 2014).

A International Standard Organization (ISO) tem como definição que os óleos essenciais são produtos obtidos por meios de destilação por arraste de vapor d’água como também pela prensa do pericarpo de frutos cítricos (SILVA, 2005). São misturas complexas de monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados e também podendo conter quantidades significativas de diterpenos e outros constituintes dependendo das plantas que produzem o óleo essencial (STEFFENS, 2010; SERAFINI et al., 2002), ocasionalmente, é possível encontrar arilpropanoides somados a moléculas menores como álcoois, cetonas, aldeídos (SIANI, 2000).

São compostos provenientes do metabolismo secundário das plantas e têm funções de proteção contra herbívoros e patógenos, além de atrativos para polinização e disseminação das sementes pelos animais, inibição da concorrência entre espécies (alelopatia), simbiose com microrganismos e plantas (TAIZ e ZEIGER, 2013; SOUZA et

al., 2010), do mesmo modo, protegem de estresse abiótico (mudanças de temperatura, níveis de luz, exposição à radiação ultravioleta, quantidade de água e deficiência de nutrientes minerais) (CASTRO et al., 2005).

Além do seu uso na perfumaria e cosméticos, possuem uma grande variedade de aplicações sendo fonte de matéria prima para a indústria farmacêutica, de alimentos, de tintas, na agricultura, no controle de doenças e pragas e em produtos de higiene e limpeza (BIASI e DESCHAMPS, 2009).

Cada constituinte do óleo essencial tem sua origem por diferentes vias metabólicas, os terpenoides se formam pela via da desoxi-xilulose-5-fosfato (DOXP) no citoplasma; os arilpropanoides pela via do chiquimato, e estes, por sua vez, são de suma importância para algumas espécies pelas suas características de odor e sabor. Todas essas vias têm estudos cada vez mais aprofundados como por exemplo a síntese do mentol e metil chavicol que possuem atividades antioxidantes, inseticidas e antibacterianas (BIASI e DESCHAMPS, 2009; TRANCOSO, 2013).

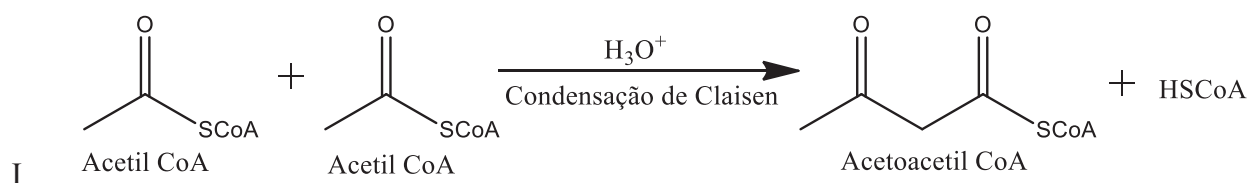
1.1. Terpenoides

Os terpenoides são sintetizados por duas vias distintas: a via do ácido mevalônico (MVA), que ocorre no citoplasma, e a via do metil eritritol fosfato (MEP), que ocorre nos cloroplastos e outros plastídios.

1.1.1. Via do Mevalonato (MVA)

A condensação de Claisen entre duas moléculas de acetil coenzima A forma o acetoacetil coenzima A (Equação I, Figura 1), seguido de adição aldólica para formar o 3(*S*)-3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) (Equação II, Figura 1).

A molécula de HMG-CoA é reduzida com NADPH, obtendo o ácido mevalônico (Equação III, Figura 1) que reage com ATP formando o ácido difosfato mevalônico (Equação IV, Figura 1) que após uma descarboxilação e perda de uma hidroxila forma o pirofosfato de isopentenila (Equação V, Figura 1). A isomerização do pirofosfato de isopentenila (IPP) leva a formação do pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) (Equação VI, Figura 1) (Dewick, 2001).



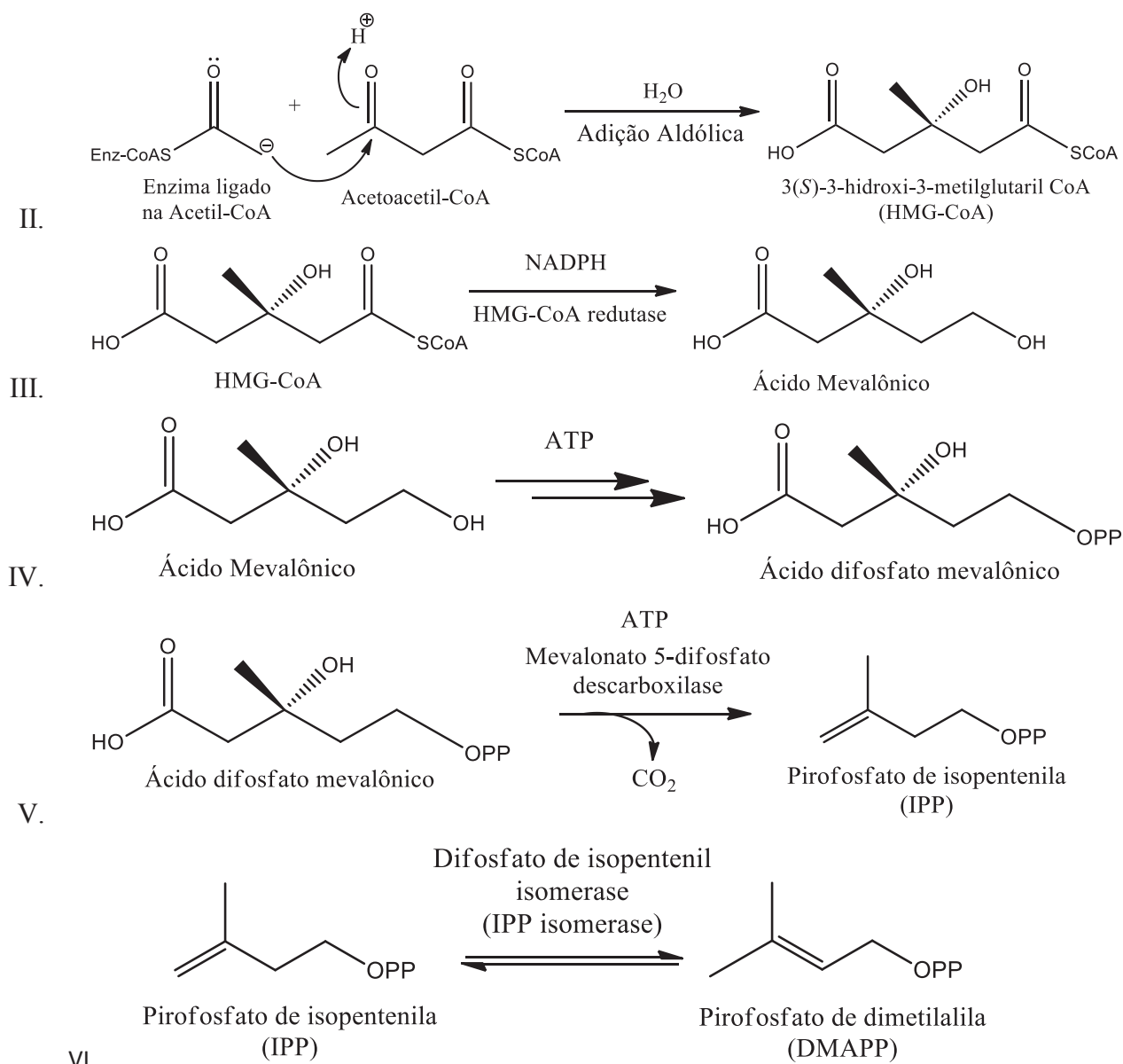


Figura 1. Via do Mevalonato (MVA).

Fonte: Dewick (2001).

1.1.2. Via do Metil Eritritol Fosfato (MEP)

A reação entre 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato e NADPH com a enzima 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato redutase (DOXP) forma o 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) (Equação I, Figura 2), após algumas etapas, forma 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclopirofosfato (Equação II, Figura 2) que, após perder uma molécula de água, resulta no difosfato 4-hidroxi-3-metil-but-2-enil, e este sendo reduzido pela enzima difosfato 4-hidroxi-3-metil-but-2-enil redutase origina tanto o IPP quanto o DMAPP (Equação III, Figura 2) (Dewick, 2001).

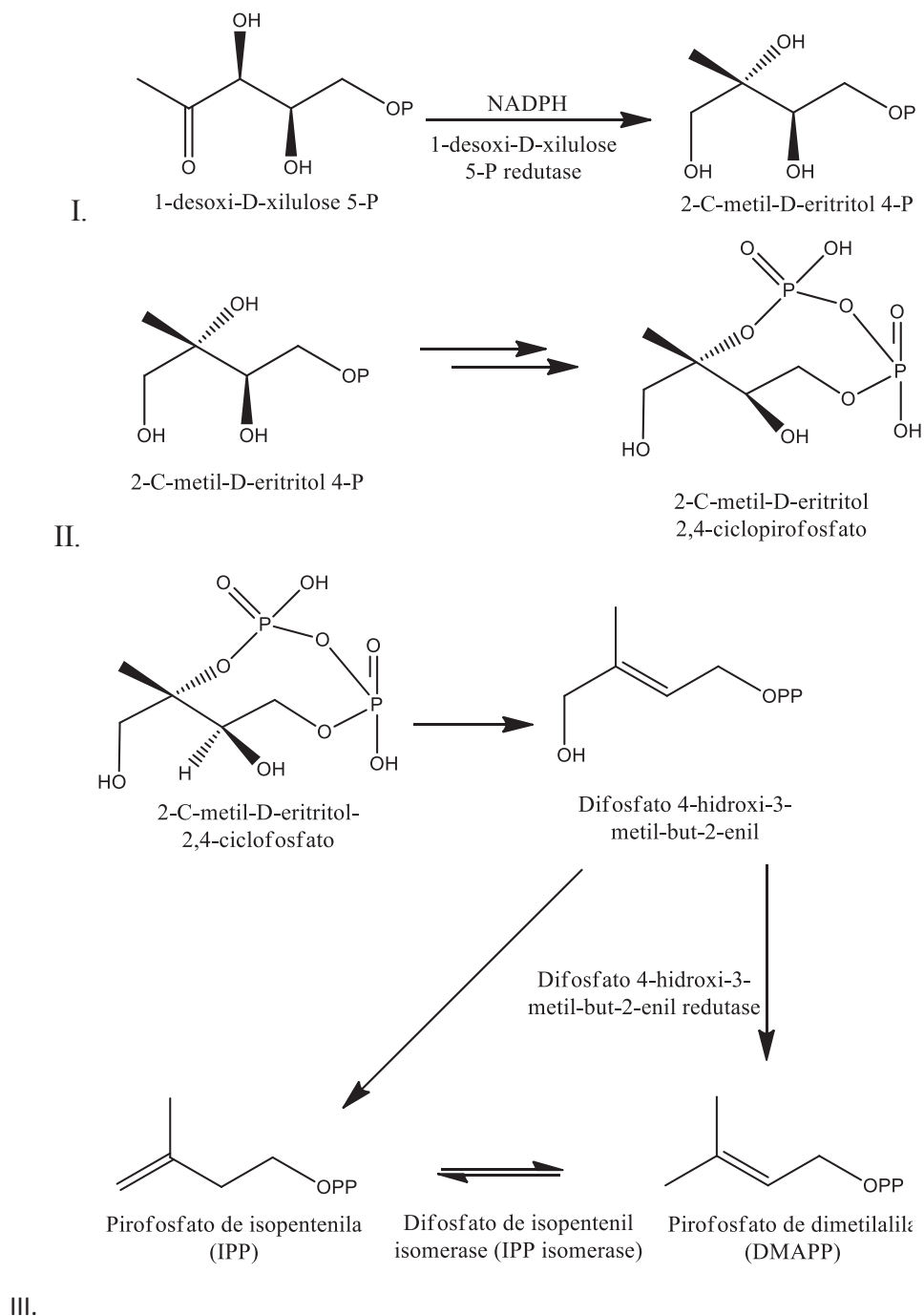


Figura 2. Via do Metil Eritritol Fosfato (MEP).

Fonte: Dewick (2001).

1.1.3. Formação dos Terpenos

São estruturas sintetizadas a partir de moléculas de cinco átomos de carbono chamadas de isoprenos (Figura3). A biossíntese de terpenoides envolve a reação entre o pirofosfato de isopentenila (IPP) e pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) formando o difosfato de geranila (GPP) (QUIQUI, 2015).

A reação ocorre inicialmente com a perda do grupo difosfato do DMAPP formando um carbocátion alílico, que posteriormente sofre um ataque nucleofílico da ligação dupla do IPP, seguindo da perda de um próton (H_r) formando uma ligação dupla *trans* (*E*). A condensação das unidades de IPP e DMAPP ocorre predominantemente no sentido cabeça-cauda, e em alguns casos menos frequentes no sentido cabeça-cabeça (DEWICK, 2001).

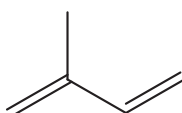


Figura 3. Estrutura do isopreno (2-metil-1,3-butadieno).

Essas condensações formam compostos conhecidos como monoterpenos (C_{10} – 10 átomos de carbono), sesquiterpenos (C_{15} – 15 átomos de carbono), diterpenos (C_{20} – 20 átomos de carbono) e triterpenos (C_{30} – 30 átomos de carbono) (Figura 4).

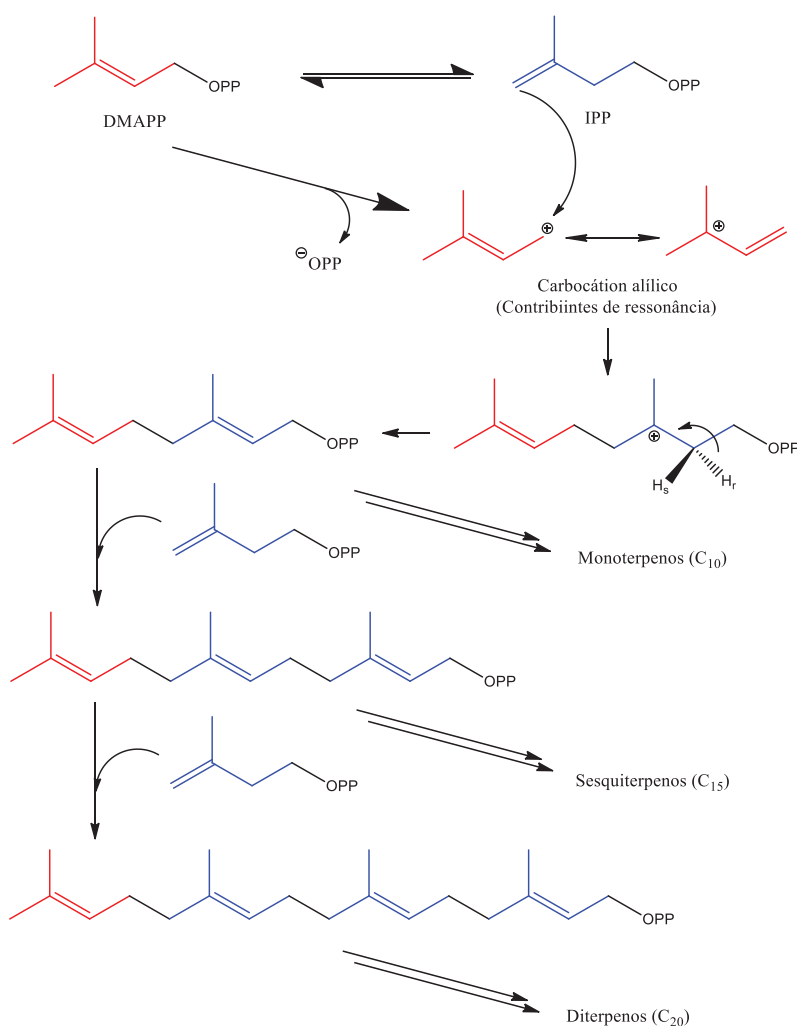


Figura 4. Síntese dos Terpenos.

Fonte: Dewick (2001).

Essas estruturas ficam sujeitas as diversas reações químicas como oxidação ou redução, isomerização, entre outros, gerando grande diversidade estrutural atribuindo à classe dos terpenoides como o maior grupo de produtos naturais (BIASI e DESCHAMPS, 2009), sendo que nos óleos essenciais encontram-se presentes em maior proporção os monoterpenos e sesquiterpenos (QUIQUI, 2015; MELO, 2005).

Os sesquiterpenos (-) β -bisaboleno e o (-) -zingibereno e os monoterpenos α -felandreno encontrados no eucalipto, mentol na menta, e o citral na cidreira são alguns exemplos desses constituintes presentes em óleos essenciais (NICARETA, 2006).

A maioria dos óleos essenciais possuem diversas atividades biológicas como ação antimicrobiana, fungicida, antiviral, anti-hiperglicêmica, anti-inflamatória e antiparasitária. Os monoterpenos são muito voláteis, facilmente extraídos por vapores d'água tendo várias aplicações graças às suas características organolépticas, porém nem sempre os constituintes de maior quantidade são os responsáveis por suas propriedades (MACHADO e FERNANDES, 2011).

De acordo com Dewick (2001), os monoterpenos podem ser agrupados conforme sua estrutura química como *p*-mentano, pinano, canfeno (Bornano), isocanfeno, fencheno, careno e tujano (Figura 5), e partindo dessas estruturas podem-se encontrar vários derivados que poderão ser identificados utilizando a técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas.

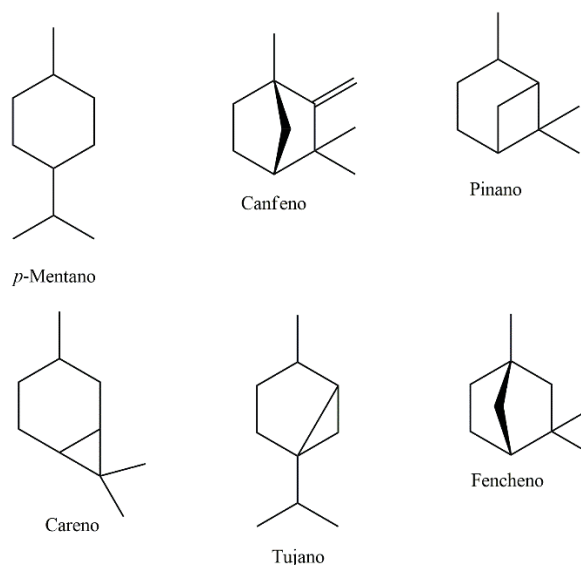


Figura 5. Principais classes de monoterpenos.

Comparativamente, o estudo dos sesquiterpenos é mais complexo em relação aos monoterpenos devido a maior variabilidade dos núcleos básicos dessa classe (Figura 6).

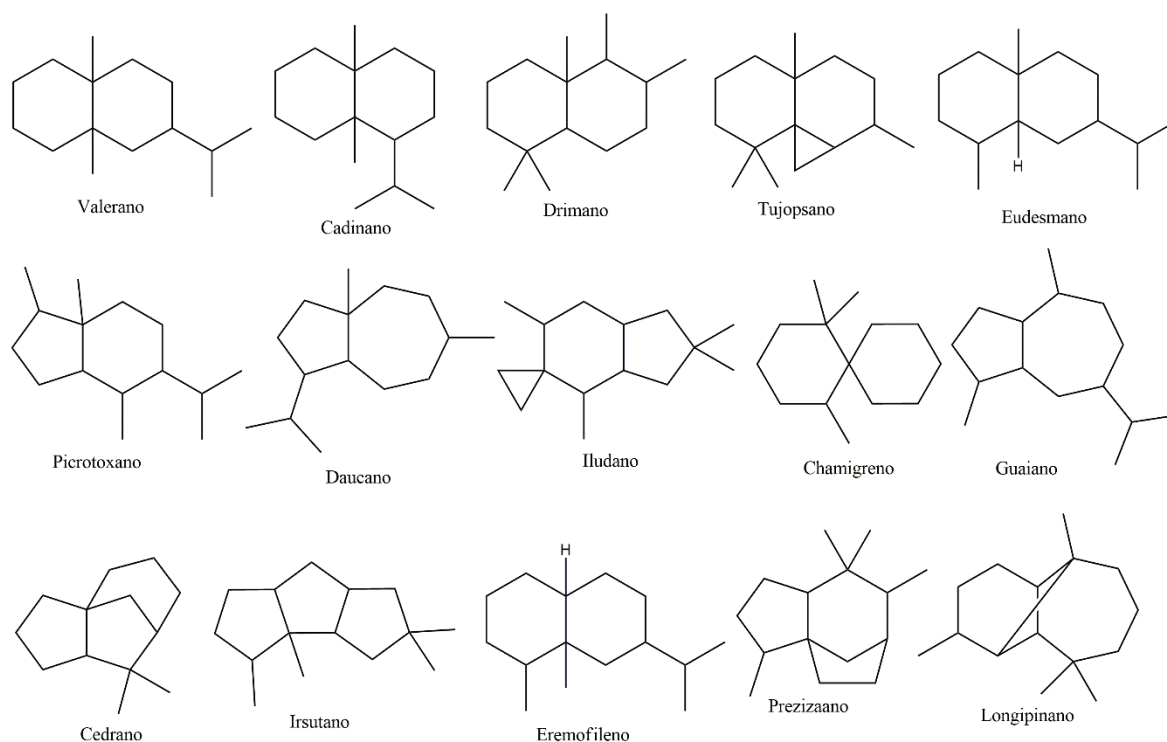


Figura 6. Principais classes de sesquiterpenos.

A metodologia mais utilizada para identificação e qualificação de óleos essenciais é a cromatografia em fase gasosa (CG) acoplada com espectrômetro de massas (EM) ou detector por ionização de chamas (DIC) para análises quantitativas. Usos típicos da cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) incluem teste de pureza de uma substância em particular, ou separação de diversos constituintes de uma mistura (as quantidades relativas de um determinado constituinte também podem ser verificadas) (CARDEAL e MARRIOTT, 2009).

A cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa permite realizar em uma só operação, para uma amostra da ordem de 1µL, uma análise qualitativa junto com uma indicação das proporções em que se encontram os componentes (BANDONI, 2008). Quando se dispõe de substância padrão, a calibração do equipamento permite uma análise quantitativa exata da amostra (STEFFENS, 2010).

1.2. Família Piperaceae

Representada por herbáceas, arbustos ou árvores de pequeno porte com alguns exemplares epífitos ou lianas, são pertencentes da classe de plantas Magnoliopsida que inclui diversas variedades de pimentas (SANTOS et al., 2014). Predominância na região tropical, essa família possui quatro gêneros: (*Ottonia*, *Peperomia*, *Piper* e *Pothomorphe*) e aproximadamente 2.500 espécies (a maioria pertencente aos gêneros *Piper* e *Peperomia*),

sendo que no Brasil ocorrem quatro gêneros e em torno de 292 espécies (FLORA DO BRASIL, 2019; PACHECO et al., 2016).

Possuem folhas simples, apresentando estípulas ou não, alternas e menos verticiladas, observa-se em alguns casos textura carnosa e rugosa, ornamentais no gênero *Peperomia* e inflorescência tipo espiga com raras exceções, terminal, axiliar ou opostas às folhas como no gênero *Piper*. Algumas espécies de *Piper* são utilizadas como medicinais, como por exemplo a pariparoba (*Piper peltatum*), a caapeba (*Piper umbellatum*) e o falso-jaborandi (*Piper spp.*), além disso, podem ser usadas como condimento, por exemplo a pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) (ESALQ / USP, 2019).

Possuem relatos de ocorrências nas regiões norte, nordeste, centro-oeste, sudeste e sul, nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal com diferentes tipos de vegetação como Área Antrópica, campo de Várzea, Floresta Ciliar, Palmeiral, Floresta Ombrófila Mista, entre outros (FLORA DO BRASIL, 2019). As espécies de *Piper* são encontradas por suas características de pequenos arbustos ou árvores, apresentando nós foliares geniculados com folhas com bases assimétricas e as do gênero *Peperomia* são reconhecidas por serem plantas geralmente carnosas e também um dos principais exemplares dentre as epífitas deste ecossistema.

Os óleos essenciais de espécies de *Piper* também são amplamente estudados. Andrade e colaboradores relataram a identificação de 141 constituintes do óleo essencial de *P. dilatatum*, majoritariamente constituído de sesquiterpenos (31,5% - 87,7%) e sesquiterpenos oxigenados (1,8% - 49,4%) (ANDRADE, 2011).

Soletti (2015) em sua pesquisa com *P. cernuum* identificou 27 constituintes sendo constituída principalmente por sesquiterpenos oxigenados enquanto na *P. amplum* identificou 43 substâncias com a maioria identificada como monoterpenos e sesquiterpenos (SOLETTI, 2015).

Matasyoh e colaboradores, por sua vez, relataram que o óleo essencial de *P. capense* pode ser usado como larvicida, apresentando efetividade de mais de 80% após 24 h numa concentração de 100 ppm, não sendo prejudicial à natureza nem aos moradores que cultivam a planta contra o vetor da malária. Esse óleo é constituído principalmente por mono (31%) e sesquiterpenos (44%) (MATASYOH, 2011).

Em 2012, Lima e colaboradores extraíram o óleo essencial de *P. aleyreanum*, composto principalmente de mono e sesquiterpenos, e verificaram que o óleo possui atividade antinociceptiva, anti-inflamatória e propriedades gastro protetoras (LIMA et al., 2012). Sauter e colaboradores (2012) extraíram o óleo essencial de *P. hispidinervum*,

também composto principalmente por mono e sesquiterpenos, e relataram atividade amebicida contra *Amoeba polyphaga* (SAUTER et al., 2012). Potzernheim e colaboradores (2012) estudaram a variabilidade da composição do óleo essencial das folhas de quatro populações de *P. aduncum* L. (coletadas em Brazlândia, Parque do Guará, Córrego Bananal e Fazenda Água Limpa) e observaram diferenças em relação ao número de compostos identificados (46 ou 65 constituintes). Para a comercialização deste óleo essencial, é necessário um controle sobre o crescimento da planta, além de observar o local do plantio, temperatura, clima e outros fatores que possam interferir neste controle, para que a composição química do óleo vendido seja sempre a mesma (POTZERNHEIM et al., 2012).

Em 2013, Sperotto e colaboradores extraíram o óleo essencial de *P. gaudichaudianum*, que é utilizada popularmente como anti-inflamatória, e relataram que o óleo essencial não é mutagênico para o experimento realizado por eles, mas apresentou um efeito citotóxico contra o fungo *Saccharomyces cerevisiae* (SPEROTTO, 2013).

Frente às questões de saúde atuais e a crescente rejeição dos consumidores em relação aos conservantes de alimentos têm levado a um crescente interesse no uso de óleos essenciais de plantas como agentes alternativos em alimentos para o controle de deterioração e presença de patógenos (CALO et al., 2015; RAUT e KARUPPAYIL, 2014).

Diversas pesquisas têm buscado potenciais candidatos naturais de aditivos alimentares que apresentem um amplo espectro de atividades antioxidantes e antimicrobianas e que melhorem a qualidade e a vida útil dos alimentos perecíveis. Tais produtos promoveriam a substituição de produtos químicos sintéticos com efeitos indesejáveis (carcinogenicidade, toxicidade, teratogenicidade e períodos lentos de degradação) que levam a problemas ambientais e na saúde humana (RAUT e KARUPPAYIL, 2014).

1.2.1. *Piper caldense* C. DC.

A *P. caldense* C. DC. é arbusto com 2 a 3 metros de altura. Suas folhas são alternas, glabras em ambas as faces e possuem estípulas pouco evidentes. As espigas são eretas e voltadas para baixo e medem de 3 a 5 cm de comprimento. As flores são protegidas por bractéola triangular subpeltada, franjadas marginalmente; o androceu é composto por quatro estames; o gineceu possui ovário súpero, estilete curto e três estigmas; o fruto é drupa glabra e obovada (ROJAS, 2015).

Ocorre no Norte (Pará e Tocantins), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte), Centro-Oeste (Distrito Federal e Goiás),

Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Paraná e Santa Catarina), predominante na Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, nos tipos de vegetação de Área Antrópica, Campo Rupestre, Floresta Ciliar ou Galeria, Floresta Ombrófila (Floresta Pluvial) e Floresta Ombrófila Mista (FLORA DO BRASIL, 2019).



Fonte: O autor.

1.2.2. *Piper solmsianum* C. DC.

A *P. solmsianum* C. DC. é um arbusto glabro que mede 1 a 3 metros de altura, com ramos estriados, glabros, entrenós 3-14 cm de comprimento. As folhas apresentam formato oval – arredondada, ápice acuminado, cordada na base, medindo 5,5 - 20 cm de largura e 8 - 23 cm de comprimento, glabras, nervuras secundárias penatiforme, salientes na face dorsal (epiderme inferior) em número de 4 de cada lado, as quais se entrecruzam e se anastomosam (formando uma rede), pecíolo com 2,5 - 6,5 cm de comprimento, glabro. Inflorescência em espiga solitária, com 5 mm de diâmetro e 6-15 cm de comprimento, pedúnculo com 1-1,5 cm de comprimento; com 3 estames. Os frutos são drupas, com formato inversamente piramidal – triangular e glabro. Estigmas sésseis. Floresce nos meses de setembro, outubro, novembro e em dezembro. Encontra-se em frutificação nos meses de abril, junho e dezembro. É conhecida popularmente por caapeba ou pariparoba.

Ocorre no Norte (Amazonas), Nordeste (Bahia), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), predominante na Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, nos tipos de vegetação de Área

Antrópica, Campo Rupestre, Floresta Ciliar ou Galeria, Floresta Ombrófila (Floresta Pluvial) e Restinga (FLORA DO BRASIL, 2019).



Fonte: O autor.

1.2.3. *Piper umbellatum* L.

A espécie *P. umbellatum* é um subarbusto perene, ereto, multicaule com os ramos angulosos, nodosos de cor marrom esverdeado, medindo quando adulto de 1-3 m de altura. As folhas são grandes, de consistência herbácea, arredondadas, rugosas com margens inteiras, ápice subagudo e base cordiforme, dotadas de glândulas translúcidas, medindo em torno de 14-24 cm de comprimento e 17-25 cm de largura; possui pecíolo puberulento, sulcado longitudinalmente, medindo de 11-22 cm de comprimento e terminando em bainha alargada que envolve o nó. As inflorescências são axilares com um pedúnculo comum de 10-15 cm de comprimento, formando espigas dispostas em umbelas, medindo 6 a 9 cm de comprimento com grande número de flores pequenas congestas possuindo 2 estames. O fruto é glabro do tipo drupa com 0,5-0,6 mm de comprimento. Floresce nos meses de março a junho e de outubro a dezembro. A raiz se apresenta de diferentes espessuras (5 mm a 3 cm de diâmetro), de cor pardacenta, estriada longitudinalmente com saliências verrucosas. É lenhosa, tortuosa e aromática quando fresca (MATTANA, 2009).

Ocorre no Norte (Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco e Sergipe), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás e Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), predominante na Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, nos tipos de vegetação de Área Antrópica, Cerrado (lato sensu),

Floresta Ciliar ou Galeria, Floresta Ombrófila (Floresta Pluvial) e Restinga (FLORA DO BRASIL, 2019).



Fonte: O autor.

1.2.4. *Piper xylosteoides* Kunth

Arbustos ou subarbustos, 0,4-1,7 metros de altura, caules subdicotômicos com entrenós superiores glabros, sulcados, 1,3-2,9-5,0 cm de comprimento. Folhas com pecíolo glabro, 4-8-16 mm de comprimento, com bainha curta basal, perfis lanceolados, 2-5 mm de comprimento, bractéola 4-10-14 mm, glabra, lâminas simétricas ou levemente assimétricas, ovadas a lanceoladas, 5,8-7,8-10,5 cm de comprimento, 1,5-3,1-5,1 cm de largura, relação comprimento/largura 1,9-2,6-4,4 : 1, cartáceas, glabras em ambas as faces; face abaxial com placas de cera epicuticular, base geralmente simétrica, atenuada a subcordada, ápice agudo a acuminado, venação pinada, nervuras 5-8 em cada lado, subopostas, distribuídas uniformemente a partir da principal, com dois pares mais agudos surgindo próximos à base, salientes e glabras em ambas as faces, amareladas; margem revoluta ou plana. Inflorescências opositifólias ou terminais, em espigas, 0,8-2,4-3,7 cm de comprimento, eretas, pedúnculos glabros, 4-6-15 mm de comprimento. Flores com brácteas triangulares, glabras; estames 3; estigmas 3, sésseis. Drupas globosas, obpiramidais-trigonais, glabras (GUIMARÃES et al., 2010; PLANTAS DA FLORESTA ATLÂNTICA, 2009).

Ocorre no Norte (Pará), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), predominante na Amazônia, Cerrado,

Mata Atlântica, nos tipos de vegetação de Cerrado (lato sensu), Floresta Ciliar ou Galeria, Floresta Ombrófila (Floresta Pluvial), Floresta Ombrófila Mista e Restinga (FLORA DO BRASIL, 2019).



Fonte: O autor.

1.3. Quimiometria

Área da química que possibilita o estudo simultâneo de variáveis em diferentes categorias aplicando métodos matemáticos e estatísticos a fim de selecionar experimentos com o máximo de informação química a partir da análise dos dados obtidos (OTTO, 2007). As técnicas quimiométricas têm o objetivo de desenvolver modelos empíricos ou semi-empíricos a partir dos dados utilizados para medir uma quantidade de propriedades de um sistema tendo como base medições de outras propriedades.

Devido ao alto valor monetário ou tempo longo da análise, a utilização de métodos de correlação é o mais recomendado para estimar as propriedades químicas das amostras, na qual podem ser citadas análises realizadas nas regiões do infravermelho (próximo e médio) que empregam modelos de calibração multivariadas para obter determinações quantitativas (NAGATA, BUENO E PERALTA-ZAMORA, 2001).

Essa calibração tem o objetivo de determinar um item específico dentro de matrizes complexas ou avaliar elementos presentes numa mistura que precisam de determinação simultânea estabelecendo uma relação dos dados químicos de duas matrizes quando há uma conexão dentre as características que descrevem cada uma delas (NAGATA, BUENO E PERALTA-ZAMORA, 2001).

Para se analisar os óleos essenciais, por conter uma grande quantidade de compostos, a Análise de Componentes Principais (Principal Component Analysis – PCA) auxilia na verificação de importantes características, como exemplo, os compostos que diferem nas estações do ano, diferentes geografias, características de partes das plantas como folhas e flores (CAVALEIRO et al., 2003; RANDRIANALIJAOANA et al., 2005; YAMAGUCHI, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Este trabalho teve o objetivo de estudar os óleos essenciais de quatro espécies de Piperaceae (*Piper caldense*, *Piper solmsianum*, *Piper umbellatum* e *Piper xylosteoides*) ampliando o conhecimento da composição química e das propriedades biológicas dessas espécies.

2.2. Específicos

- Extração de óleos essenciais das folhas de *Piper caldense*, *Piper solmsianum*, *Piper umbellatum*, *Piper xylosteoides*, através de hidrodestilação e identificação dos principais constituintes através das análises de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

- Avaliação dos óleos essenciais extraídos em função da sazonalidade, verificando possíveis marcadores quimiotaxonômicos, através das análises estatísticas de ACP.

- Realização de ensaios de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, contra 7 microrganismos (*Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus epidermidis*).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

- C8 a C19 - Saturated alkanes Std, marca Supelco - concentração 1000 µg/ mL em hexano;
- Cromatógrafo CG-EM/EM da marca Shimadzu modelo GC-2010 Plus, acoplado a detector de massas em tandem do tipo triplo quadrupolo modelo TQ8040 e injetor automático modelo AOC-5000 Plus para análises de amostras líquidas, gasosa (headspace) e microextração em fase sólida (SPME).
- Cromatógrafo Agilent 7890A equipado com detector de ionização por chama (DIC), operado a 280 °C.

3.2. Coleta e identificação do material botânico

As folhas de *Piper solmsianum* C. DC. e *Piper umbellatum* L. foram coletadas na região Sudeste, pelo Prof. Dr. Diones Krinski, município de Tapiraí, estado de São Paulo.

Os locais de coleta apresentaram coordenadas geográficas em 24°01'16" S 47°31'48" W para *P. solmsianum* e 24°02'53" S 47°34'12" W para a *Piper umbellatum* L.

As folhas das espécies de *Piper caldense* C. DC. e *Piper xylosteoides* Kunth foram coletadas na região Sul, município de Cerro Azul, estado do Paraná, pelo Dr. Wanderlei do Amaral, sob as coordenadas geográficas em 25°01'40" S 49°21'21" W para *Piper caldense* C. DC. e 24°48'06" S 49°15'47" W para *Piper xylosteoides* Kunth.

3.3. Preparação do material botânico

Após a coleta, as folhas frescas foram armazenadas em freezer a -20°C para a conservação do material no laboratório de Micropropagação de Plantas da UFPR, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do setor de Ciências Agrárias e, as demais folhas foram colocadas em estufas a 45°C para secagem no laboratório de Fitotecnia também situado no setor de Ciências Agrárias.

Foram utilizadas amostras de folhas frescas e secas para comparação de rendimento dos óleos essenciais e variação na composição química dos mesmos.

3.4. Extração e identificação dos óleos essenciais

As folhas frescas e secas das quatro espécies foram submetidas à hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado por 4 h (100 g em aproximadamente 1.000 mL de água destilada), em triplicata. As extrações foram realizadas no laboratório de Ecofisiologia, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias.

Após a realização da extração, o óleo essencial foi coletado, seco com sulfato de sódio anidro e armazenado em freezer até análise.

As análises dos óleos foram realizadas no equipamento de CG-EM Shimadzu GCMS-TQ8040 e para análise foi utilizado o programa GCMS Postrun Analysis da LabSolutions GCMS Solution versão 4.20 criado pela Shimadzu Corporation (Kyoto, Jp) e os dados coletados (TRX e Area) adicionados numa tabela no Microsoft Excel versão 2016 na qual foram calculados os índices aritméticos (VIEGAS e BASSOLI, 2007). Os principais constituintes foram identificados em cada óleo das folhas frescas e secas de *P. caldense*, *P. solmsianum*, *P. umbellatum* e *P. xylosteoides* das estações inverno, primavera, verão e outono.

Para a análise através de CG-EM a amostra foi diluída a 1% (m/v) em diclorometano e analisada nas seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (5% difenil + 95% dimetil polisiloxano), com 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Como gás de arraste foi empregado hélio com vazão de 1,02 mL min⁻¹, em modo split 1:90, estando o

injetor à 250 °C e o sistema de ionização de 70 eV. Foi injetado 1 µL de amostra na seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial 60 °C (0') até 250 °C, com aquecimento de 3 °C min⁻¹.

Os constituintes dos óleos essenciais foram identificados com base no índice aritmético (IA), determinado através da utilização de uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares saturados contendo de 8 a 24 átomos de carbono, injetados nas mesmas condições cromatográficas. Através do programa interpretativo automático, os espectros de massas dos constituintes detectados foram comparados com os espectros existentes na biblioteca de massas NIST 02 e pela análise visual comparativa com os espectros de massas da literatura Adams (2017).

A quantificação dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada em cromatógrafo em fase gasosa da marca Agilent, modelo 7890A. As análises foram realizadas em coluna capilar RTX-5 (30 m por 0,25 mm e espessura de filme 0,25 µm), sendo utilizado hidrogênio (H₂) como gás de arraste, em vazão de 1,0 mL min⁻¹. A injeção em modo splitless foi realizada com injetor a 200 °C. A temperatura do detector foi de 280 °C e o forno foi programado para uma temperatura de 60 °C, com posterior incremento de 3 °C min⁻¹ até 240 °C.

3.5. Tratamento estatístico

Após a identificação dos constituintes dos óleos essenciais analisados por GC-EM os resultados foram tratados estatisticamente por meio da Análise dos Componentes Principais (ACP) utilizando o software Matlab[®] v.7.0.1 (MathWorkInc[®]) no pacote PLS_toolbox 3.0 (Eigenvector Research, Inc.). Foi utilizado o autoescalamamento para o pré-processamento dos dados, na qual cada variável é centrada na média e dividida pelo seu desvio padrão.

3.6. Atividade antimicrobiana

Os óleos essenciais extraídos da *P. caldense*, *P. solmsianum*, *P. umbellatum* e *P. xylosteoides* foram estudadas quanto à sua atividade antimicrobiana contra sete microrganismos. Os testes foram realizados em triplicata com a colaboração da Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte na Divisão de Microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Química, Biológica e Agrícola (CPQBA) – UNICAMP.

Os microrganismos utilizados foram *Candida albicans* (TCC 776), *Bacillus subtilis* (TCC 2576), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388), *Staphylococcus aureus*

(ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708) e *Staphylococcus epidermides* (ATCC 12228).

Estes microrganismos foram adquiridos da “American Type Collection Culture” (ATCC) e “Tropical Culture Collection (TCC) e são utilizados em um programa de triagem direcionado para a identificação de produtos naturais com potencial a ser estudado como novas drogas antimicrobianas.

A subcultura dos microrganismos foi realizada durante a noite a 36 °C usando Nutrient Agar (Merck) para as bactérias e Sabouraud Dextrose Agar para a levedura. A preparação dos inóculos para os ensaios foi realizada por diluição de uma massa de células raspadas em solução de NaCl (0,85%), ajustado à escala de McFarland no 0,5 e confirmado pela leitura em espectrofotômetro a 625 nm para bactérias ou 530 nm para leveduras.

As suspensões de células foram diluídas para 10³ e 10⁴ UFC mL⁻¹ para utilização nos ensaios de atividade das bactérias e das leveduras, respectivamente. As avaliações de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram realizados conforme a CLSI (2002 e 2005), utilizando o caldo Muller-Hinton (bactérias) ou caldo RPMI-1640 (levedura) sobre uma placa de ensaio de cultura de tecidos (96 poços).

A solução estoque dos extratos brutos foi diluída e transferida para o primeiro poço, e foram feitas diluições em série de modo que as concentrações obtidas foram na faixa de 1,0 a 0,015 mg mL⁻¹. Como controle de referência foram utilizados os antibióticos cloranfenicol e nistatina (Merck) com concentração na faixa de 0,25 a 0,002 mg mL⁻¹ em triplicata. O inóculo foi adicionado a todos os poços e as placas foram incubadas a 36 °C durante 48 h.

A atividade antibacteriana foi detectada por adição de 20 µL de solução de 0,5% de TTC (cloreto de trifetil tetrazólio, Merck) aquoso. A CIM foi definida como a concentração mínima da amostra que inibiu o crescimento visível e pela indicação por coloração TTC (células mortas não são coradas pelo TTC).

No caso da levedura *Candida albicans*, após o período de incubação, verificou-se a mudança na coloração do meio RPMI-1640 passando da cor original rosa para amarelo, sendo que essa mudança indica uma acidificação do meio pelo crescimento dos microrganismos.

As concentrações bactericidas e fungicidas mínimas (CBM e CFM, respectivamente) foram determinadas por meio de plaqueamento de 10 µL do material contido no poço correspondente ao da CIM e dos três poços subsequentes de maior concentração, nos meios sólidos adequados para cada microrganismo, após, as placas

contendo bactérias e leveduras foram incubadas de acordo com a temperatura determinada para cada micro-organismo. As CBM e CFM foram definidas como as concentrações mínimas responsáveis por inibir totalmente o crescimento bacteriano ou fúngico (99,9%) nos meios de cultura sólidos específicos (CLSI, 2005).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os óleos essenciais das folhas frescas e secas das espécies de *Piper caldense*, *Piper solmsianum*, *Piper umbellatum* e *Piper xylosteoides* foram estudados para conhecimento da sua composição química, comparação quanto a sua constituição em função da sazonalidade e comparação entre as espécies e entre material fresco e seco. Foram analisados os óleos das quatro estações do ano (inverno, primavera, verão e outono) e os constituintes majoritários foram identificados. Os rendimentos dessas extrações constam na tabela 1.

Tabela 1. Extrações e rendimentos dos óleos essenciais das quatro espécies de *Piper*.

	<i>P. caldense</i>		<i>P. solmsianum</i>		<i>P. umbellatum</i>		<i>P. xylosteoides</i>	
	Folhas frescas	Folhas secas	Folhas frescas	Folhas secas	Folhas frescas	Folhas secas	Folhas frescas	Folhas secas
	R ¹ ± dp ²	R ¹ ± dp ²	R ¹ ± dp ²	R ¹ ± dp ²	R ¹ ± dp ²	R ¹ ± dp ²	R ¹ ± dp ²	R ¹ ± dp ²
Inverno	0,60 ± 0,06	1,00 ± 0,06	0,20 ± 0,10	0,50 ± 0,06	0,10 ± 0,06	0,60 ± 0,10	0,20 ± 0,03	0,50 ± 0,05
Primavera	0,30 ± 0,06	1,40 ± 0,10	0,10 ± 0,06	0,40 ± 0,03	0,20 ± 0,08	0,60 ± 0,06	0,10 ± 0,06	1,00 ± 0,35
Verão	0,40 ± 0,10	2,10 ± 0,21	0,20 ± 0,08	0,50 ± 0,10	0,10 ± 0,08	0,50 ± 0,10	0,20 ± 0,06	1,00 ± 0,06
Outono	0,70 ± 0,12	1,20 ± 0,15	0,30 ± 0,05	0,60 ± 0,08	0,10 ± 0,06	0,50 ± 0,03	0,50 ± 0,10	0,90 ± 0,06

¹ - Rendimento (massa / massa)

² - Desvio padrão

Observa-se na tabela 1 que para as quatro espécies, os maiores rendimentos foram obtidos das folhas secas. Na comparação entre as espécies, os maiores rendimentos foram da *P. caldense* tanto para as folhas frescas como para as secas. As outras três espécies tiveram rendimentos parecidos quando comparadas as folhas frescas. A *P. caldense* na estação do verão teve um maior rendimento (2,1%) em relação as outras três estações e também entre as demais espécies estudadas. Nas estações da primavera e do outono, nota-se que os valores dos rendimentos para as folhas secas são próximos entre *P. xylosteoides* e *P. caldense*.

Os rendimentos dos óleos essenciais da espécie *P. umbellatum* foram descritos com valores entre 0,1% a 0,6 % (MARTINS, 1998; MORAES, 1983; LUZ et al., 1999; MESQUITA et al., 2005; MATTANA, 2005; PERIGO, 2016) e comparando com este estudo observa-se que os valores estão dentro da faixa descrita nos trabalhos citados.

Para a *P. xylosteoides*, Dognini (2012) apresenta dois rendimentos de diferentes locais no estado de Santa Catarina, o primeiro extraído de Orleans (2,3%), e o segundo de São Bonifácio (3,2%), sendo esses valores bem superiores aos rendimentos deste trabalho (0,1% - 1,0%) e do observado por Potzernheim e colaboradores (2006^b) cujo valor foi 1,8% e Ferraz e colaboradores (2010) com 0,2% de rendimento.

Após as análises por CG-EM dos óleos essenciais das folhas frescas e secas de *P. caldense*, *P. solmsianum*, *P. umbellatum* e *P. xylosteoides* das estações inverno, primavera, verão e outono, seus principais constituintes foram identificados e estão descritos nas tabelas a seguir, respectivamente.

4.1 *Piper caldense* C. DC.

A análise das classes dos constituintes dos óleos de *P. caldense* extraídos das folhas frescas nas quatro estações apresenta porcentagens próximas, e apontam os hidrocarbonetos sesquiterpênicos como a classe predominante (média de 61%) seguido dos sesquiterpenos oxigenados (média de 29%) e hidrocarbonetos monoterpênicos (média de 10%) de um total de 32 constituintes representando 98% do óleo total identificado (Tabela 2, Gráfico 1).

Os principais compostos, considerando as quatro estações do ano, são δ -cadineno (12%), *E*-cariofileno (10%), germacreno D (9%), biciclogermacreno (8%), α -cadinol (6%) (Tabela 2, Figura 7).

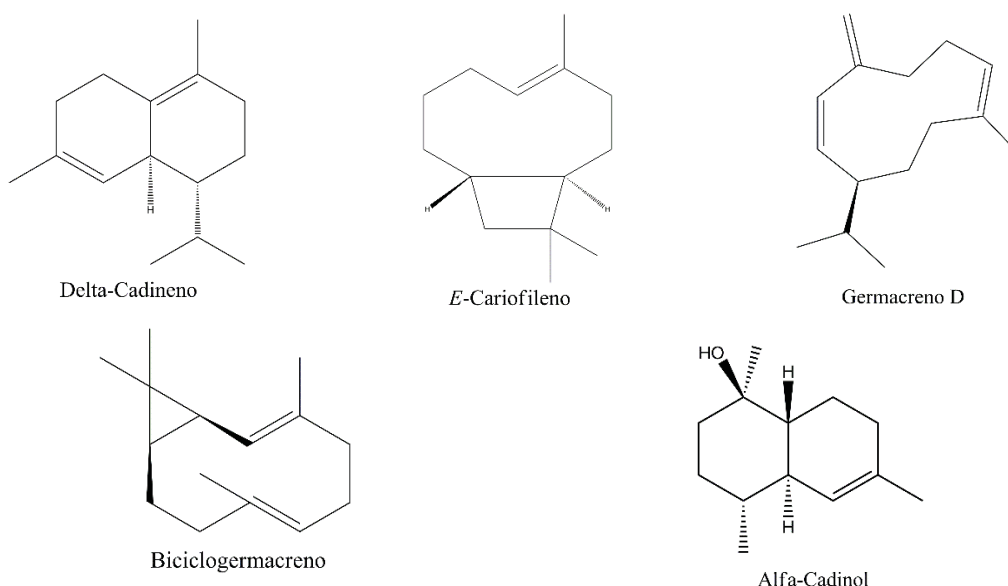


Figura 7. Compostos majoritários dos óleos essenciais das folhas frescas de *P. caldense* nas quatro estações do ano.

Os hidrocarbonetos monoterpênicos identificados (10% da composição) α -pineno e β -pineno aparecem com os menores valores de porcentagem para a estação do inverno (2,46% e 2,10%, respectivamente) e o mesmo valor para ambos na primavera (4,79%), o α -felandreno tem o seu menor valor na primavera (0,68%) e o maior no inverno (2,24%), o mesmo ocorre com as classes de sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados, para as estações do verão e outono, as porcentagens não tiveram alterações significativas.

Tabela 2. Principais constituintes identificados nos óleos essenciais das folhas frescas de *Piper caldensen*as quatro estações do ano.

Constituintes	I. A. ¹	I. A. ²	Inverno (%) ³	Primavera (%) ³	Verão (%) ³	Outono (%) ³
α -Pinoeno	932	932	2,46 \pm 0,78	4,79 \pm 0,02	4,03 \pm 0,59	4,02 \pm 0,29
β -Pinoeno	974	976	2,10 \pm 0,60	4,79 \pm 0,05	3,91 \pm 0,63	3,90 \pm 0,30
α -Felandreno	1002	1005	2,24 \pm 0,17	0,68 \pm 0,06	1,13 \pm 0,31	1,16 \pm 0,14
Limoneno	1024	1028	1,12 \pm 0,09	1,13 \pm 0,10	1,03 \pm 0,01	1,09 \pm 0,04
Total			7,91	11,38	10,11	10,18
Hidrocarbonetos Monoterpênicos						
δ -Elemeno	1335	1338	1,04 \pm 0,16	0,63 \pm 0,01	0,72 \pm 0,08	0,75 \pm 0,05
α -Copaeno	1374	1376	1,03 \pm 0,08	1,52 \pm 0,08	1,42 \pm 0,13	1,38 \pm 0,05
E-Cariofileno	1417	1419	8,63 \pm 0,21	11,15 \pm 0,09	10,34 \pm 0,52	10,32 \pm 0,27
β -Copaeno	1430	1429	0,61 \pm 0,04	1,24 \pm 0,01	1,05 \pm 0,13	1,04 \pm 0,06
Aromadendreno	1439	1439	1,81 \pm 0,07	3,32 \pm 0,12	2,80 \pm 0,30	2,81 \pm 0,18
Humuleno	1452	1453	3,31 \pm 0,05	4,33 \pm 0,06	3,99 \pm 0,20	3,99 \pm 0,10
γ -Muuroleno	1478	1477	3,52 \pm 0,08	5,99 \pm 0,31	5,52 \pm 0,60	5,29 \pm 0,17
Germacreno D	1484	1481	21,37 \pm 1,44	0,64 \pm 0,01	6,66 \pm 4,72	7,11 \pm 2,11
δ -Selineno	1492	1492	0,44 \pm 0,03	1,00 \pm 0,02	0,82 \pm 0,12	0,82 \pm 0,06
Biciclogermacreno	1500	1497	11,52 \pm 0,49	5,88 \pm 1,89	6,11 \pm 1,72	7,15 \pm 0,75
α -Muuroleno	1500	1501	1,42 \pm 0,06	1,94 \pm 0,15	1,91 \pm 0,14	1,82 \pm 0,05
δ -Amorfeno	1511	1508	1,30 \pm 0,10	0,95 \pm 0,05	1,06 \pm 0,05	1,06 \pm 0,05
γ -Cadineno	1513	1515	2,73 \pm 0,08	3,40 \pm 0,07	3,27 \pm 0,15	3,21 \pm 0,04
δ -Cadineno	1522	1525	8,54 \pm 0,18	13,13 \pm 1,15	12,67 \pm 1,23	11,97 \pm 0,38
Germacreno B	1559	1558	1,15 \pm 0,09	0,74 \pm 0,06	0,88 \pm 0,07	0,87 \pm 0,05
Total			68,41	55,85	59,24	59,58
Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos						
Elemol	1548	1550	2,12 \pm 0,20	0,99 \pm 0,14	1,17 \pm 0,26	1,29 \pm 0,06
E-nerolidol	1561	1565	1,70 \pm 0,04	0,49 \pm 0,04	0,85 \pm 0,26	0,87 \pm 0,12
Globulol	1590	1584	2,40 \pm 0,07	1,78 \pm 0,14	2,04 \pm 0,10	2,00 \pm 0,08
Guaiol	1600	1599	2,35 \pm 0,10	5,86 \pm 0,47	5,20 \pm 0,87	4,88 \pm 0,27
1- <i>epi</i> -Cubenol	1627	1630	0,75 \pm 0,09	1,37 \pm 0,07	1,13 \pm 0,12	1,15 \pm 0,07
γ -Eudesmol	1629	1633	1,43 \pm 0,08	1,93 \pm 0,03	1,79 \pm 0,12	1,77 \pm 0,06
α -Cadinol <epi>	1638	1642	0,92 \pm 0,07	* *	0,59 \pm 0,09	0,60 \pm 0,05
α -Muurolol	1640	1643	3,04 \pm 0,29	4,58 \pm 1,33	3,14 \pm 0,05	3,75 \pm 0,67
Cubenol	1645	1648	0,73 \pm 0,04	2,05 \pm 0,22	1,84 \pm 0,34	1,69 \pm 0,10
β -Eudesmol	1649	1651	1,05 \pm 0,13	2,30 \pm 0,53	1,53 \pm 0,17	1,76 \pm 0,29
α -Eudesmol	1652	1654	0,97 \pm 0,05	2,84 \pm 0,55	1,90 \pm 0,29	2,12 \pm 0,32
α -Cadinol	1652	1656	4,54 \pm 0,52	7,03 \pm 1,38	7,35 \pm 0,83	6,60 \pm 0,36
Bulnesol	1670	1669	1,69 \pm 0,05	1,56 \pm 0,72	2,11 \pm 0,13	1,77 \pm 0,28
Total			23,67	32,77	30,65	30,24
Sesquiterpenos oxigenados						

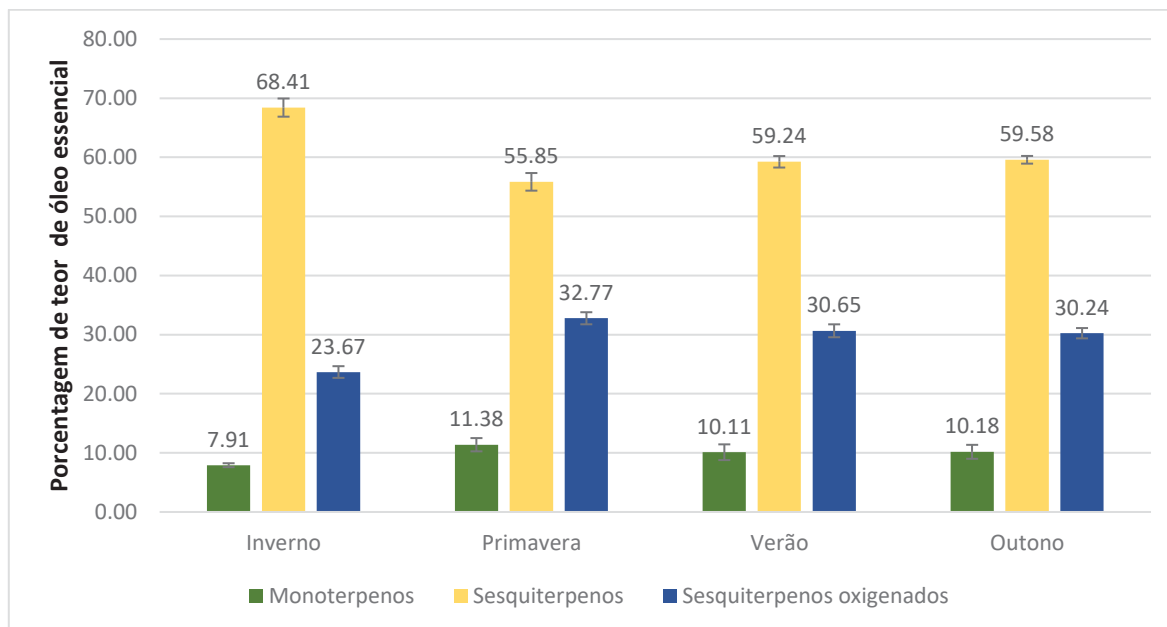
¹ - Índice aritmético da literatura (ADAMS, 2017).

² - Índice aritmético calculado

³ - Média Aritmética das análises em triplicata com desvio padrão.

* - Não detectado

Gráfico 1. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas frescas de *Piper caldense* em relação às estações do ano.



No gráfico 1, pode-se observar nas estações primavera, verão e outono que a média das concentrações dos compostos agrupados por classe apresentou pequenas variações, porém estando dentro do desvio padrão. Apenas a estação de inverno que apresentou maiores teores de sesquiterpenos e menores valores de mono e sesquiterpenos oxigenados em relação às outras extrações.

Rocha e colaboradores (2016) analisaram os óleos essenciais das folhas, raízes e caules da mesma espécie. Para as folhas observou um total de 28 compostos representando 83,4% do total do óleo sendo os compostos majoritários: α -cadinol (19%), α -muurolol (9%) e o cubenol (3,2%) com valores superiores dos encontrados nesta pesquisa (Tabela 2). O composto δ -cadineno (5,6%) foi observado em menor porcentagem comparado aos nossos dados (9,64%) enquanto os compostos tujopsan-2- β -ol (7,4%), linalool (3,2%), γ -amorfeno (3,1%) e α -terpineol (3%) não foram encontrados neste trabalho. Comparando com os resultados desta pesquisa, os compostos majoritários não são coincidentes, e pode-se justificar pela região diferente de coleta, onde os fatores bióticos e abióticos podem interferir na composição dos óleos (ROCHA et al., 2016).

Analisando as folhas secas de *P. caldense*, os constituintes dos óleos essenciais mostraram, pelas médias das triplicatas, os hidrocarbonetos sesquiterpênicos como predominantes (48%) seguido dos sesquiterpenos oxigenados (41%) e hidrocarbonetos

monoterpênicos (11%) de um total de 28 constituintes representando 99% do óleo total (Tabela 3, Gráfico 2).

Os principais constituintes presentes nas quatro estações são globulol (15%), δ -cadineno (10%), *E*-cariofileno (8%), guaiol (7%), γ -muuroleno (6%) e α -pineno (6%) (Tabela 3, Figura 8).

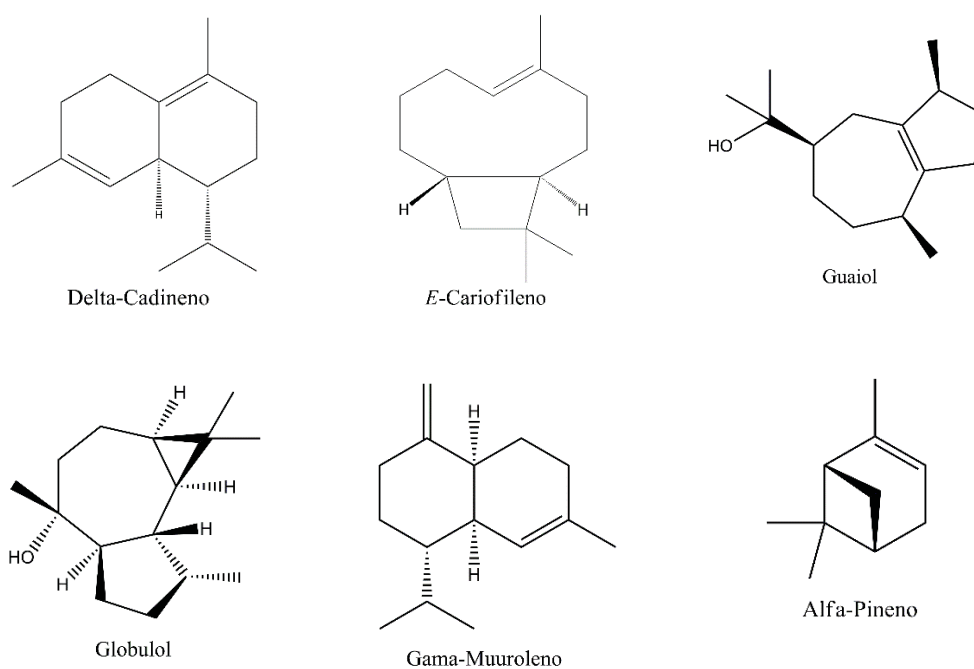


Figura 8. Compostos majoritários dos óleos essenciais das folhas secas de *P. caldense* nas quatro estações do ano.

Tabela 3. Principais constituintes identificados nos óleos essenciais das folhas secas de *Piper caldense* nas quatro estações do ano.

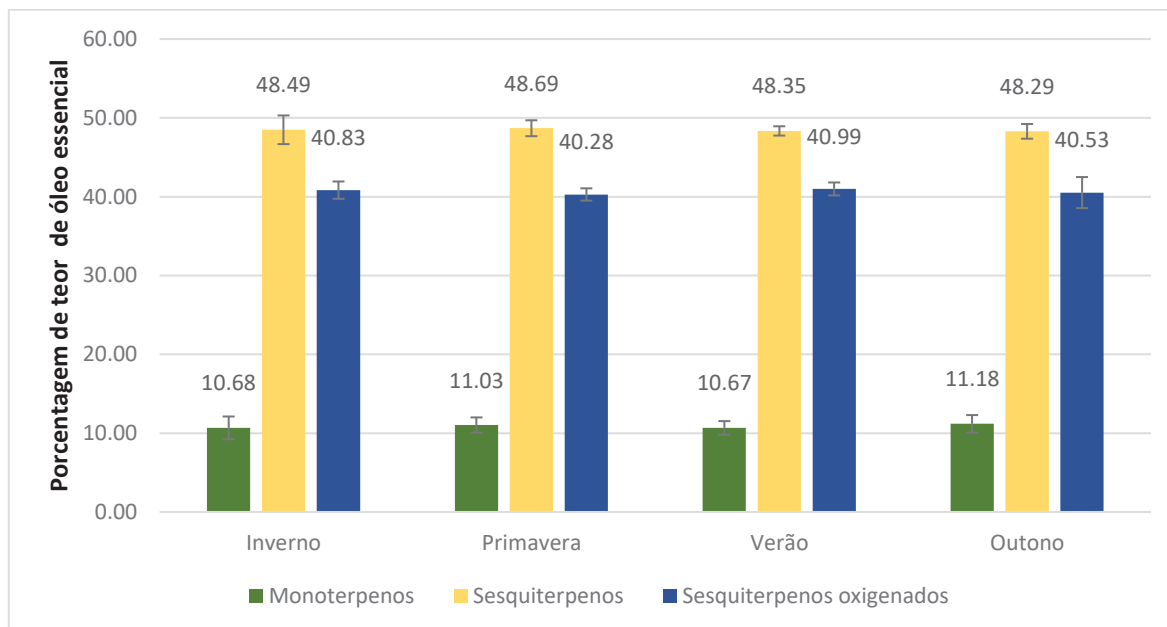
Constituintes	I. A. ¹ I. A. ²		Inverno (%) ³	Primavera (%) ³	Verão (%) ³	Outono (%) ³
α -Pinoeno	932	932	5,77 \pm 0,17	6,00 \pm 0,32	5,63 \pm 0,20	6,22 \pm 0,72
β -Pinoeno	974	976	4,17 \pm 0,32	4,27 \pm 0,07	4,13 \pm 0,14	4,17 \pm 0,18
Limoneno	1024	1028	0,73 \pm 0,07	0,75 \pm 0,02	0,91 \pm 0,17	0,79 \pm 0,05
Total			10,68	11,03	10,67	11,18
Hidrocarbonetos Monoterpenicos						
α -Copaeno	1335	1338	2,12 \pm 0,04	2,13 \pm 0,01	2,21 \pm 0,08	2,15 \pm 0,03
E-Cariofileno	1374	1376	7,85 \pm 0,20	7,84 \pm 0,02	7,58 \pm 0,28	7,72 \pm 0,16
β -Copaeno	1417	1419	0,85 \pm 0,05	0,83 \pm 0,01	1,02 \pm 0,20	0,90 \pm 0,07
Aromadendreno	1430	1429	4,00 \pm 0,10	4,03 \pm 0,02	3,97 \pm 0,06	3,98 \pm 0,08
Humuleno	1439	1439	3,05 \pm 0,00	3,05 \pm 0,01	3,08 \pm 0,03	3,05 \pm 0,02
γ -Muuroleno	1452	1453	6,01 \pm 0,12	6,04 \pm 0,02	5,85 \pm 0,20	5,94 \pm 0,14
Germacreno D	1478	1477	2,27 \pm 0,26	2,18 \pm 0,06	2,35 \pm 0,16	2,26 \pm 0,11
δ -Selineno	1484	1481	2,57 \pm 1,87	1,94 \pm 0,42	2,67 \pm 0,62	2,39 \pm 0,79
Biciclogermacreno	1492	1492	4,07 \pm 2,84	5,01 \pm 0,63	3,99 \pm 0,88	4,32 \pm 1,25
α -Muuroleno	1500	1497	1,36 \pm 0,01	1,36 \pm 0,00	1,51 \pm 0,14	1,40 \pm 0,04
γ -Cadineno	1500	1501	3,24 \pm 0,04	3,25 \pm 0,01	3,26 \pm 0,01	3,24 \pm 0,04
δ -Cadineno	1511	1508	10,06 \pm 0,06	10,02 \pm 0,04	9,65 \pm 0,41	9,87 \pm 0,21
Germacreno B	1548	1550	1,03 \pm 0,06	1,01 \pm 0,02	1,19 \pm 0,19	1,07 \pm 0,06
Total			48,49	48,69	48,35	48,29
Hidrocarbonetos Sesquiterpenicos						
Elemol	1513	1515	0,46 \pm 0,07	0,48 \pm 0,01	0,66 \pm 0,19	0,53 \pm 0,06
E-nerolidol	1561	1565	1,84 \pm 0,11	1,80 \pm 0,03	1,95 \pm 0,15	1,86 \pm 0,06
Globulol	1590	1584	15,09 \pm 0,62	15,27 \pm 0,12	14,34 \pm 0,95	14,83 \pm 0,58
Guaiol	1600	1599	6,75 \pm 1,04	6,39 \pm 0,24	6,56 \pm 0,10	6,54 \pm 0,37
Cubenol	1627	1630	1,94 \pm 0,02	1,93 \pm 0,01	2,04 \pm 0,11	1,96 \pm 0,02
γ -Eudesmol	1629	1633	1,83 \pm 0,02	1,83 \pm 0,01	1,94 \pm 0,11	1,86 \pm 0,02
α -Cadinol <epi>	1638	1642	2,74 \pm 0,85	2,45 \pm 0,20	2,81 \pm 0,31	2,66 \pm 0,35
Cubenol	1640	1643	1,29 \pm 0,02	1,29 \pm 0,00	1,43 \pm 0,15	1,33 \pm 0,04
β -Eudesmol	1645	1648	1,28 \pm 0,06	1,26 \pm 0,02	1,43 \pm 0,17	1,32 \pm 0,06
α -Eudesmol	1649	1651	4,15 \pm 0,06	4,16 \pm 0,01	4,11 \pm 0,06	4,12 \pm 0,07
α -Cadinol	1652	1654	1,30 \pm 0,24	1,22 \pm 0,06	1,45 \pm 0,22	1,32 \pm 0,12
Bulnesol	1652	1656	2,17 \pm 0,12	2,20 \pm 0,02	2,25 \pm 0,06	2,20 \pm 0,05
Total			40,83	40,28	40,99	40,53
Sesquiterpenos oxigenados						

¹ - Índice aritmético da literatura (ADAMS, 2017).

² - Índice aritmético calculado

³ - Média Aritmética das análises em triplicata com desvio padrão.

Gráfico 2. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas secas de *Piper caldense* em relação às estações do ano.

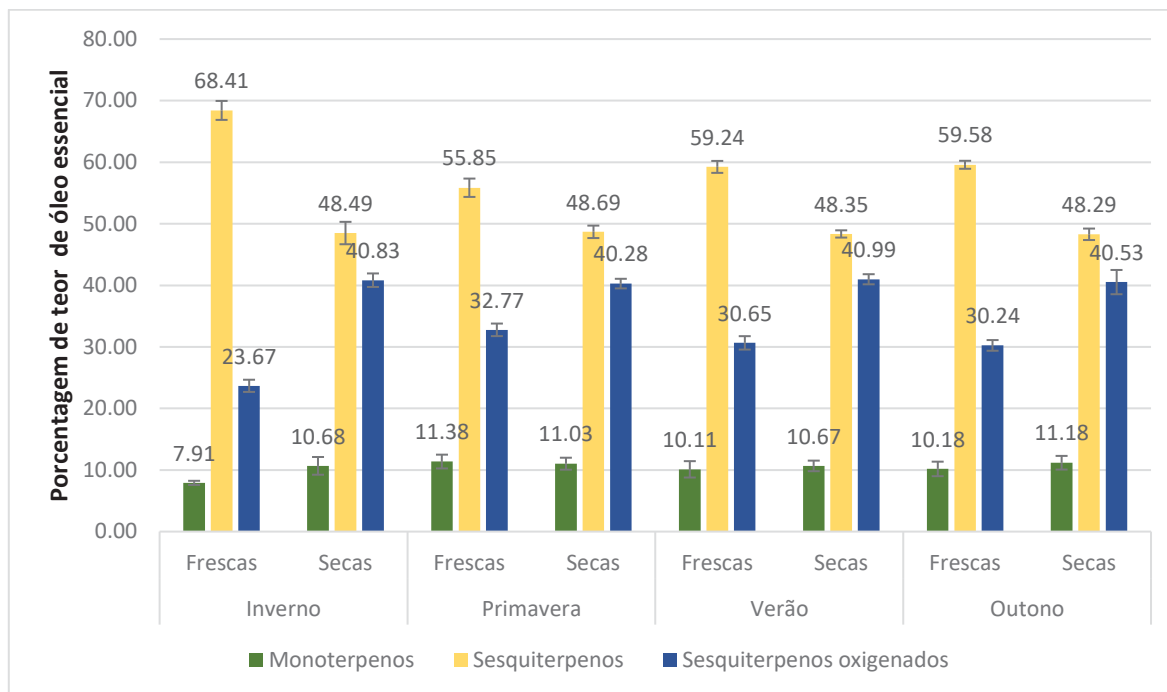


Pode-se observar no gráfico 2 que as três classes dos terpenos permanecem constantes nas quatro estações do ano. Araújo (2011), em seus estudos de algumas espécies de *Piper*, na cidade de Recife – PE, incluindo a *Piper caldense*, relatou a caracterização dos óleos desta espécie como sendo 9,7% de monoterpenos, 81,7% de sesquiterpenos e 0,5% de arilpropanoides diferenciando muito deste estudo, pois além de não serem detectados os arilpropanoides, a porcentagem de sesquiterpenos variou em aproximadamente 20% entre os dois trabalhos.

Comparando os óleos essenciais obtidos das folhas frescas e secas nas quatro estações do ano, observa-se que as porcentagens dos monoterpenos são próximas, enquanto que para os sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados há uma diferença nos teores entre as folhas frescas e secas por estação, observando que os sesquiterpenos diminuem nas folhas secas (61% nas folhas frescas e 48% nas folhas secas em média para ambas) e os sesquiterpenos oxigenados aumentam nas folhas frescas para as secas (29% nas folhas frescas e 41% nas folhas secas em média para ambas) (Gráfico 3).

O maior valor observado dos sesquiterpenos encontra-se na estação do inverno (68%) para folhas frescas e o menor valor (48%) na estação do outono para as folhas secas (Gráfico 3).

Gráfico 3. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas frescas e secas de *Piper caldense* em relação às estações do ano.



Existem na literatura apenas três estudos de óleos essenciais com a espécie *P. caldense*. Na pesquisa de Souto (2014) foram estudadas as atividades biológicas dos óleos sem sua identificação química, os quais apresentaram atividade antimicrobiana.

No estudo de Rocha e colaboradores (2016), folhas de *P. caldense* foram coletadas em Recife e seus óleos essenciais extraídos sendo identificado um total de 28 compostos representando 83,4% do total do óleo. A classe predominante foi sesquiterpenos seguido por sesquiterpenos oxigenados e monoterpenos. Os majoritários identificados foram α -cadinol (19%), α -muurolol (9%), tujopsan-2- β -ol (7%), δ -cadineno (6%), os mesmos encontrados neste estudo exceto o tujopsan-2- β -ol, porém os valores são diferentes aos descritos no trabalho de Rocha et al. (2016), sendo α -cadinol (5%), α -muurolol (3%).

No trabalho apresentado por Gubert e colaboradores no V Simpósio Ibero-americano de Plantas Medicinais, foi descrito que os compostos majoritários foram óxido de cariofileno (11,9%), δ -cadineno (9,6%), espatulenol (9,1%), valenceno e biciclogermacreno (6,7%) e γ -muuroleno (6,0%).

Após a identificação dos compostos químicos presentes nos óleos essenciais de *P. caldense* realizou-se a Análise de Componentes Principais (ACP), que permitiu observar as semelhanças e diferenças entre as amostras de óleo essencial das folhas, comparando época de coleta (quatro estações do ano) e o método de secagem (frescas e secas).

A figura 9 apresenta o gráfico de *scores* obtido com as médias das triplicatas dos óleos essenciais, onde se observa que a PC1 explica 62,23% da variância dos dados enquanto que aPC2 explica 34,27%, totalizando 96,50% da variância dos dados.

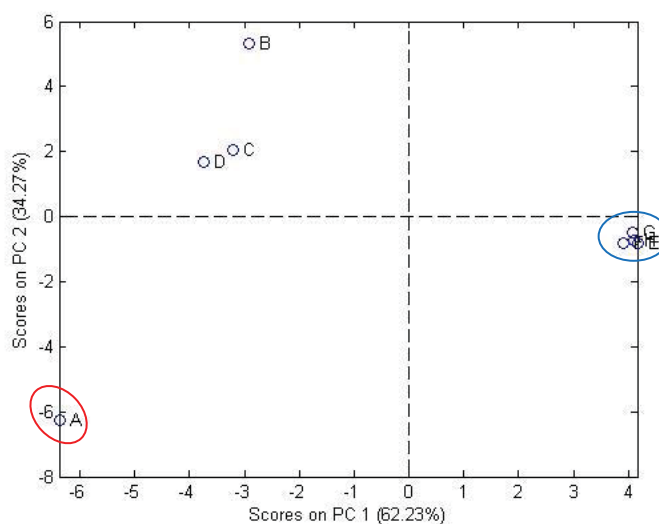


Figura 9. Scores obtidos com a média das triplicatas dos óleos essenciais das folhas frescas e secas de *Piper caldense* coletadas nas quatro estações do ano (**A** – Inverno fresca. **B** – Primavera fresca. **C** – Verão fresca. **D** – Outono fresca. **E** - Inverno seca. **F** – Primavera seca. **G** – Verão seca. **H** – Outono seca).

O gráfico de *scores* mostra nítida diferença entre as amostras de folhas frescas e secas pela PC1, sendo que as amostras de folhas secas se encontram no quadrante positivo da PC1 enquanto que as amostras de folhas frescas se encontram no quadrante negativo dessa PC. Pela PC2 também é possível observar separação da amostra de inverno das outras estações de folhas frescas. As amostras de folhas secas não são influenciadas pela PC2, estando todas próximas ao eixo zero.

Quanto a estação do ano observa-se que para as amostras de folhas secas não houve diferença significativa entre a quantidade e a identidade dos compostos encontrados nos óleos essenciais nas quatro estações, o que resultou em um agrupamento dessas amostras na ACP (círculo azul). Já para as amostras de folhas frescas verificou-se que a estação de inverno se diferenciou das demais estações, pois a mesma se encontra no quadrante negativo da PC2, enquanto as outras estações estão no quadrante positivo dessa PC.

O gráfico de *loadings* (Figura 10) mostra quais compostos são responsáveis pelas semelhanças e diferenças entre os óleos essenciais de folhas de *P. caldense* observadas no gráfico de *scores*. Analisando as amostras de folhas frescas verifica-se que os compostos **3** (α -felandreno), **12** (germacreno D), **14** (biciclogermacreno) e **20** (elemol) estão em maior

quantidade na estação inverno, enquanto que os compostos **4** (Limoneno), **7** ((*E*)-cariofileno), **8** (β -copaeno), **10** (humuleno), **15** (α -muuroleno), **18** (δ -cadineno), **27** (α -muurolol), **28** (cubenol), **29** (β -eudesmol) e **31** (α -cadinol) estão em maior quantidade nas estações primavera, verão e outono.

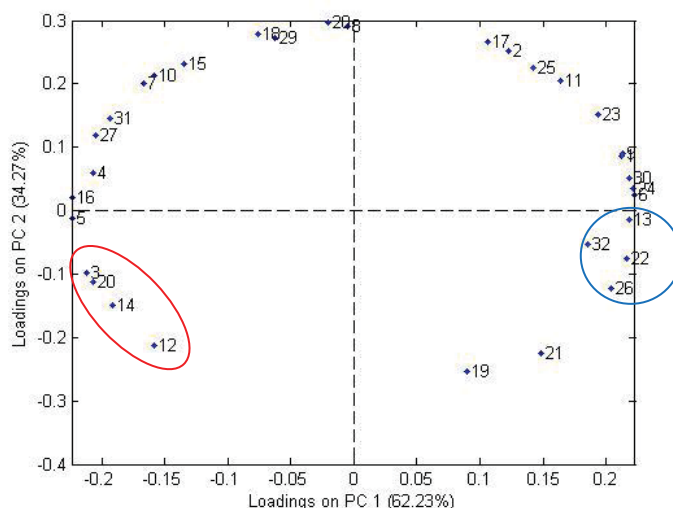


Figura 10. Loadings obtido com a média das triplicatas dos óleos essenciais das folhas frescas e secas de *Piper caldense* coletadas nas quatro estações do ano.

Analisando as amostras de folhas secas, observou-se pelo gráfico de scores que não existe separação entre as estações do ano, como já foi mencionado, e o gráfico de loadings mostra que os compostos **13** (δ -selineno), **22** (globulol), **26** (*epi*- α -cadinol) e **32** (bulnesol) são os responsáveis por agrupar as quatro estações. Esses mesmos compostos são os principais responsáveis por diferenciar as folhas secas de frescas, visto que, pelo gráfico de loadings eles estão em maior quantidade nas folhas secas.

4.2 *Piper solmsianum* C. DC.

Nas extrações das folhas frescas de *Piper solmsianum* foram identificados 21 compostos, representando 98% do óleo, tendo predominância dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos (58%), seguido pelos hidrocarbonetos monoterpênicos (25%) e os sesquiterpenos oxigenados (17%) (Tabela 4, Gráfico 4).

Dos monoterpenos, pode-se observar que o α -pineno (um dos majoritários) nas estações de inverno e outono tiveram valores próximos, em compensação, na primavera e no verão verificou-se um aumento expressivo (15% e 26%, respectivamente) e γ -terpineno teve substancial aumento nas estações de primavera e outono, enquanto no inverno e no verão demonstraram os menores valores obtidos das extrações.

Para a classe dos sesquiterpenos, os majoritários foram biciclogermacreno (valor médio de 25%) e germacreno D (valor médio de 16%).

O sesquiterpeno biciclogermacreno teve o maior valor encontrado na estação do outono (38%), seguido do inverno (25%), verão (21%) e menor concentração na primavera (14%). Germacreno D aparece somente nas estações do inverno e verão, já o δ -cadineno (13%) e α -copaeno (10%) possuem seus maiores valores na estação da primavera, e não foram detectados no outono.

Para os sesquiterpenos oxigenados, tem-se destaque o composto *epi*-cubebol para a estação da primavera com seu valor em 12% (Figura 11).

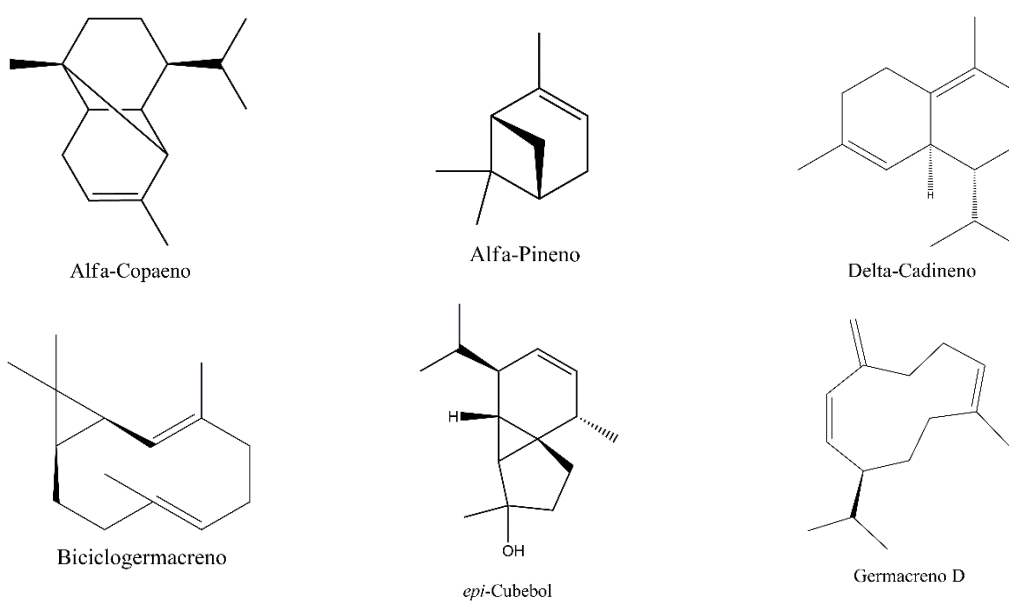


Figura 11. Compostos majoritários dos óleos essenciais das folhas frescas de *P. solmsianum* nas quatro estações do ano.

Tabela 4. Principais constituintes identificados nos óleos essenciais das folhas frescas de *Piper solmsianum* nas quatro estações do ano.

Constituintes	I. A. ¹	I. A. ²	Inverno (%) ³	Primavera (%) ³	Verão (%) ³	Outono (%) ³
α -Pineno	932	932	10,18 \pm 2,77	14,91 \pm 0,16	26,35 \pm 3,90	10,57 \pm 0,81
Sabineno	969	972	1,20 \pm 0,14	2,29 \pm 0,19	* *	1,36 \pm 0,55
β -Pineno	974	976	1,25 \pm 0,54	1,79 \pm 0,04	1,45 \pm 0,26	1,22 \pm 0,60
Mirceno	988	991	2,54 \pm 0,92	1,09 \pm 0,06	* *	1,09 \pm 0,65
ρ -Cimeno	1020	1024	2,03 \pm 0,37	1,10 \pm 0,21	* *	2,74 \pm 0,53
(E)- β -Ocimeno	1044	1048	1,37 \pm 0,23	0,60 \pm 0,03	1,04 \pm 0,23	1,65 \pm 0,08
γ -Terpineno	1054	1058	2,42 \pm 0,49	4,02 \pm 0,02	1,71 \pm 0,34	4,30 \pm 0,44
Total			21,00	25,81	30,54	22,94
Hidrocarbonetos Monoterpênicos						
α -Copaeno	1374	1376	5,36 \pm 0,62	9,79 \pm 0,04	5,20 \pm 0,40	* *
α -Gurjuneno	1409	1413	4,85 \pm 1,52	3,06 \pm 0,03	* *	8,55 \pm 1,75
(E)-Cariofileno	1417	1419	3,05 \pm 0,27	4,21 \pm 0,02	3,19 \pm 1,05	5,10 \pm 0,79
<i>allo</i> -Aromadendreno	1458	1461	2,56 \pm 0,55	5,36 \pm 0,02	3,04 \pm 0,32	5,20 \pm 0,61
γ -Gurjuneno	1475	1478	0,90 \pm 0,62	0,40 \pm 0,01	* *	2,50 \pm 1,29
Germacreno D	1484	1481	15,19 \pm 3,67	* *	17,18 \pm 1,48	* *
Biciclogermacreno	1500	1497	25,37 \pm 2,14	14,45 \pm 0,40	20,82 \pm 2,74	38,43 \pm 1,05
δ -Cadinenol	1522	1525	6,86 \pm 2,17	13,31 \pm 0,06	5,95 \pm 0,87	* *
Total			64,13	50,58	55,38	59,78
Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos						
<i>epi</i> -Cubebol	1493	1495	6,13 \pm 1,83	11,80 \pm 0,05	5,78 \pm 1,06	* *
Cubebol	1514	1516	2,75 \pm 0,78	1,33 \pm 0,04	1,13 \pm 0,55	4,09 \pm 1,04
Espatulanol	1577	1579	1,56 \pm 0,29	* *	1,93 \pm 0,69	2,50 \pm 0,19
Viridiflorol	1592	1584	1,77 \pm 0,96	5,23 \pm 0,02	2,07 \pm 0,65	4,57 \pm 0,34
1- <i>epi</i> -Cubenol	1627	1630	1,73 \pm 0,89	5,25 \pm 0,02	1,86 \pm 0,78	4,70 \pm 0,76
Cubenol	1645	1644	0,93 \pm 0,23	* *	1,32 \pm 0,70	1,42 \pm 0,24
Total			14,88	23,62	14,08	17,28
Sesquiterpenos oxigenados						

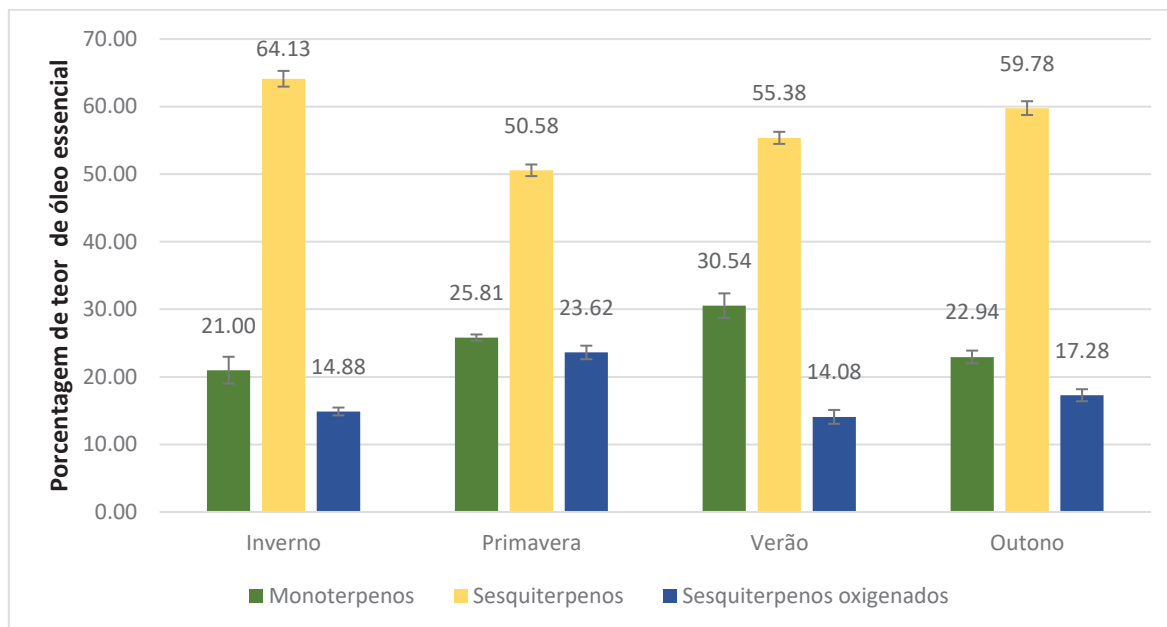
¹ - Índice aritmético da literatura (ADAMS, 2017).

² - Índice aritmético calculado

³ - Média Aritmética das análises em triplicata com desvio padrão.

* - Não detectado

Gráfico 4. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas frescas de *Piper solmsianum* em relação às estações do ano.



No gráfico 4, observa-se um aumento gradativo no teor dos monoterpenos nas estações do inverno (21%), da primavera (26%) e do verão (31%) e então a porcentagem decai para o outono (23%). Para os sesquiterpenos, o maior valor encontrado é na estação do inverno (64%), na primavera (51%) tem uma diminuição considerável na porcentagem e nas estações do verão (55%) e do outono (60%) voltam a subir. Para os sesquiterpenos oxigenados, a estação da primavera (24%) teve o maior índice encontrado, seguido do outono (17%) e no inverno (15%) e no verão (14%) manteve os mesmos indicadores.

Moreira e colaboradores (2001) identificaram 21 compostos nos óleos essenciais das folhas frescas de *P. solmsianum* sendo os majoritários o monoterpeno δ -3-careno (23,29%) e o arilpropanoide sarisan (39,23%) que apresenta atividades inseticida, bactericida e fungicida. No nosso estudo não foi observado nem arilpropanoide nem o δ -3-careno, apesar da classe dos monoterpenos ter teores significativos (20-30%) nos óleos.

Em relação aos majoritários descritos na tabela 4, os compostos α -pineno, mirceno, p -cimeno, γ -terpineno e germacreno D estão em maiores teores comparados aos apresentados por Moreira et al. (2001) e o espatulenol possui valores aproximados entre este trabalho e o citado anteriormente.

Para as folhas secas da espécie *P. solmsianum* não houve mudanças significativas em relação às estações do ano, sendo os sesquiterpenos (65%) a classe majoritária, seguida dos monoterpenos (19%) e dos sesquiterpenos oxigenados (16%) (Tabela 5 e Gráfico 5).

Os compostos majoritários encontrados nos óleos essenciais das folhas secas são os mesmos encontrados nas folhas frescas, são eles: biciclogermacreno (21% em média), seguido por germacreno D (19%), α -pineno (11%), δ -cadineno (8%), α -copaeno (6%) e *epi*-cubebol (6%).

Tabela 5. Principais constituintes identificados nos óleos essenciais das folhas secas de *Piper solmsianum* nas quatro estações do ano.

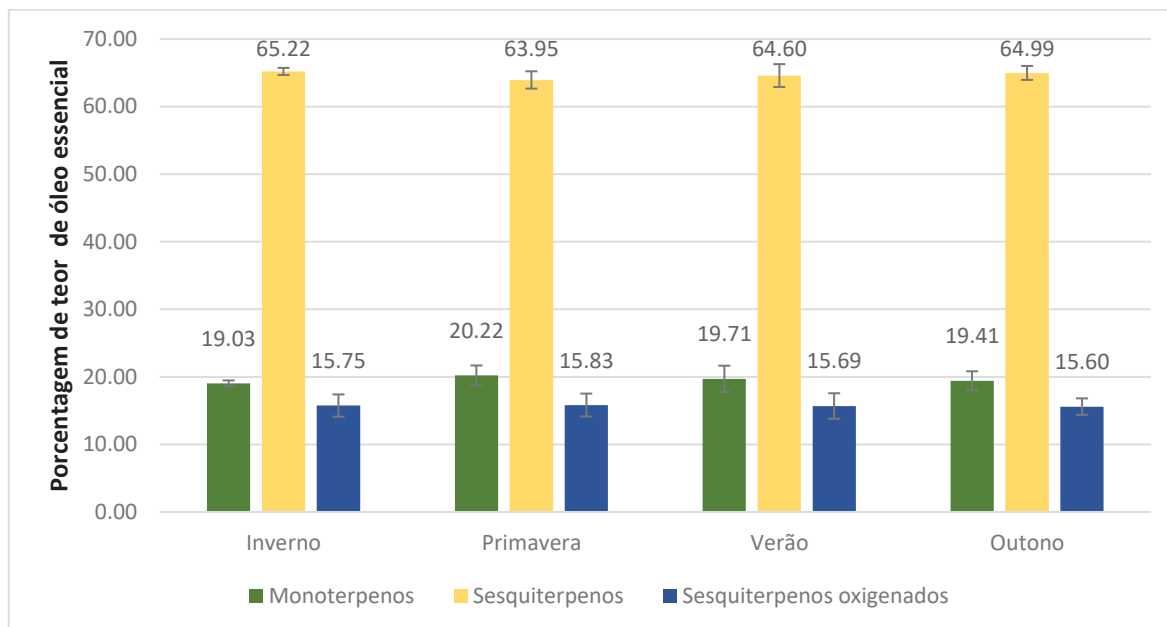
Constituintes	I. A. ¹	I. A. ²	Inverno (%) ³	Primavera (%) ³	Verão (%) ³	Outono (%) ³
α -Pineno	932	933	10,24 \pm 1,27	10,87 \pm 0,15	10,60 \pm 0,28	10,44 \pm 0,59
Sabineno	969	972	1,19 \pm 0,14	1,25 \pm 0,02	1,23 \pm 0,03	1,21 \pm 0,06
β -Pineno	974	976	1,13 \pm 0,32	1,29 \pm 0,04	1,22 \pm 0,07	1,18 \pm 0,15
Mirceno	988	992	1,66 \pm 0,74	2,03 \pm 0,09	1,88 \pm 0,16	1,78 \pm 0,34
ρ -Cimeno	1020	1024	1,70 \pm 0,22	1,59 \pm 0,03	1,63 \pm 0,05	1,66 \pm 0,10
(E)- β -Ocimeno	1044	1413	1,17 \pm 0,05	1,15 \pm 0,01	1,16 \pm 0,01	1,16 \pm 0,02
γ -Terpineno	1054	1059	1,94 \pm 0,19	2,04 \pm 0,02	2,00 \pm 0,04	1,98 \pm 0,09
Total			19,03	20,22	19,71	19,41
Hidrocarbonetos Monoterpênicos						
α -Copaeno	1374	1420	6,02 \pm 1,22	5,42 \pm 0,15	5,67 \pm 0,27	5,83 \pm 0,57
α -Gurjuneno	1409	1419	4,87 \pm 1,04	4,36 \pm 0,12	4,57 \pm 0,23	4,70 \pm 0,48
(E)-Cariofileno	1417	1462	3,27 \pm 1,41	2,57 \pm 0,17	2,87 \pm 0,31	3,05 \pm 0,66
<i>allo</i> -Aromadendreno	1458	1478	3,22 \pm 0,57	2,94 \pm 0,07	3,06 \pm 0,13	3,13 \pm 0,27
γ -Gurjuneno	1475	1482	0,90 \pm 0,09	0,95 \pm 0,01	0,93 \pm 0,02	0,92 \pm 0,04
Germacreno D	1484	1495	19,00 \pm 0,70	18,65 \pm 0,08	18,80 \pm 0,15	18,89 \pm 0,32
Biciclogermacreno	1500	1497	16,11 \pm 8,69	22,26 \pm 0,16	21,98 \pm 0,29	21,81 \pm 0,62
δ -Cadineno	1522	1516	11,83 \pm 9,35	6,81 \pm 0,05	6,72 \pm 0,09	6,67 \pm 0,20
Total			65,22	63,95	64,60	64,99
Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos						
<i>epi</i> -Cubebol	1493	1525	6,03 \pm 0,86	6,01 \pm 0,06	5,90 \pm 0,11	5,84 \pm 0,23
Cubebol	1514	1579	1,88 \pm 0,89	2,32 \pm 0,11	2,13 \pm 0,20	2,02 \pm 0,42
Spatulenol	1577	1584	1,97 \pm 0,92	1,52 \pm 0,11	1,71 \pm 0,20	1,83 \pm 0,43
Viridiflorol	1592	1630	2,28 \pm 0,58	2,57 \pm 0,07	2,45 \pm 0,13	2,38 \pm 0,27
1- <i>epi</i> -Cubenol	1627	1644	2,33 \pm 0,54	2,59 \pm 0,06	2,48 \pm 0,12	2,41 \pm 0,25
Cubenol	1645	1648	1,26 \pm 0,88	0,82 \pm 0,11	1,01 \pm 0,19	1,12 \pm 0,41
Total			15,75	15,83	15,69	15,60
Sesquiterpenos oxigenados						

¹ - Índice aritmético da literatura (ADAMS, 2017).

² - Índice aritmético calculado

³ - Média Aritmética das análises em triplicata com desvio padrão.

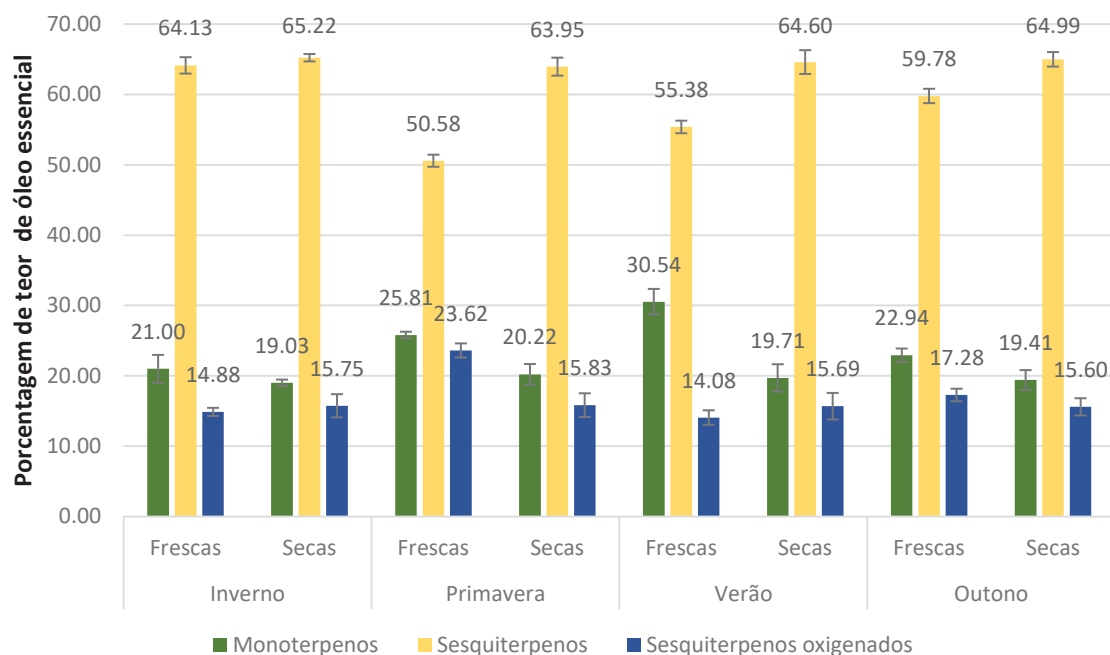
Gráfico 5. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas secas de *Piper solmsianum* em relação às estações do ano.



Não foram encontrados estudos de óleos essenciais das folhas secas de *P. solmsianum*, apenas um relato sobre estudo dos compostos não voláteis (CAMPOS et al., 2005).

Comparando os óleos essenciais entre as folhas frescas e secas (Gráfico 6) observa-se nas estações do inverno e outono que as porcentagens não tiveram variações significativas. Na primavera, houve diferenças nos teores das três classes dos terpenos, enquanto que na estação do verão, a diferença significativa ocorreu nas classes dos mono e sesquiterpenos.

Gráfico 6. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas frescas e secas de *Piper solmsianum* em relação às estações do ano.



Assim como para a *P. caldense* após a identificação dos compostos químicos presentes nos óleos essenciais de *P. solmsianum* realizou-se a ACP para verificar semelhanças e diferenças entre os óleos. A figura 12 apresenta o gráfico de scores obtido com as médias das triplicatas, e observa-se que a PC1 explica 44,65% da variância dos dados enquanto que a PC2 explica 33,31%, totalizando 79,96% da variância dos dados.

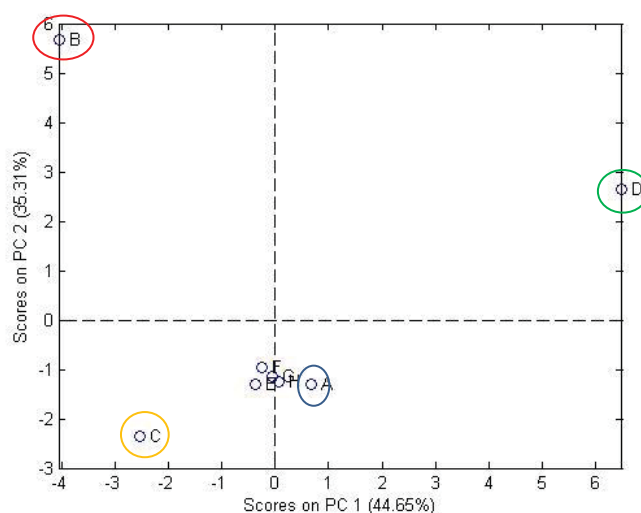


Figura 12. Scores obtidos com a média das triplicatas dos óleos essenciais das folhas frescas e secas de *Piper solmsianum* coletadas nas quatro estações do ano (A– Inverno fresca. B– Primavera fresca. C– Verão fresca. D– Outono fresca. E– Inverno seca. F– Primavera seca. G– Verão seca. H– Outono seca).

Analisando o gráfico de *scores* verifica-se que diferente do observado para a *P. caldense* não existe uma nítida separação entre as folhas frescas e secas para a *P. solmsianum*. Pela PC1 observa-se que no quadrante negativo tem-se as estações primavera fresca (B), verão fresca (C), inverno seca (E), primavera seca (F) e verão seca (G), enquanto que, no quadrante positivo estão inverno fresca (A), outono fresca (D) e outono seca (H). Pela PC2 observa-se que as estações primavera (B) e outono (D) das folhas frescas se diferem das folhas secas em todas as estações.

Com relação as estações do ano, verifica-se que, para as amostras de folhas frescas, cada estação está posicionada num quadrante diferente do gráfico de *scores*, ou seja, os óleos diferem em quantidade e/ou identidade de compostos presentes conforme muda a estação do ano. No entanto, para as amostras de folhas secas não houve diferença significativa entre os compostos encontrados nas quatro estações.

Analisando as amostras de folhas frescas, observa-se pelo gráfico de *loadings* (Figura 13) que o composto **13** (germacreno D) está em maior quantidade no verão, enquanto que os compostos **5** (*p*-cimeno), **9** (α -gurjuneno), **12** (γ -gurjuneno), **14** (biciclogermacreno) e **17** (cubebol) estão em maior quantidade no outono, o composto **3** (β -pineno) encontra-se em maior quantidade na estação da primavera e o composto **4** (mirceno) está em maior valor para a estação do inverno. Ou seja, esses compostos são os principais responsáveis por separar as amostras das quatro estações do ano das folhas frescas.

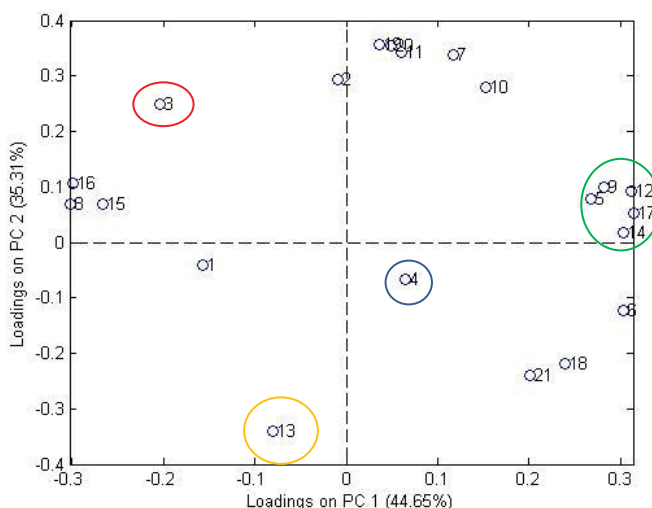


Figura 13. *Loadings* obtido com a média das triplicatas dos óleos essenciais das folhas frescas e secas de *Piper solmsianum* coletadas nas quatro estações do ano.

As amostras das quatro estações das folhas secas estão próximas da linha do zero tanto pelo PC1 quanto pela PC2, o que indica que essas amostras não apresentam maiores

ou menores quantidades de nenhum dos compostos identificados nos óleos essenciais para essa espécie.

4.3 *Piper umbellatum* L.

Ao analisar os compostos dos óleos essenciais da espécie *P. umbellatum* pode-se verificar uma grande diferença em relação as duas espécies estudadas anteriormente. Os óleos de *P. umbellatum* apresentam apenas duas classes: os hidrocarbonetos sesquiterpênicos (98,63%) e um composto da classe sesquiterpeno oxigenado (1,37%), num total de 8 compostos e 98% do total identificado, sendo os majoritários γ -muuroleno (67%), biciclogermacreno (11%) e (*E*)-cariofileno (10%) (Figura 14, Tabela 6).

Figura 14. Compostos majoritários dos óleos essenciais das folhas secas de *P. umbellatum* nas quatro estações do ano.

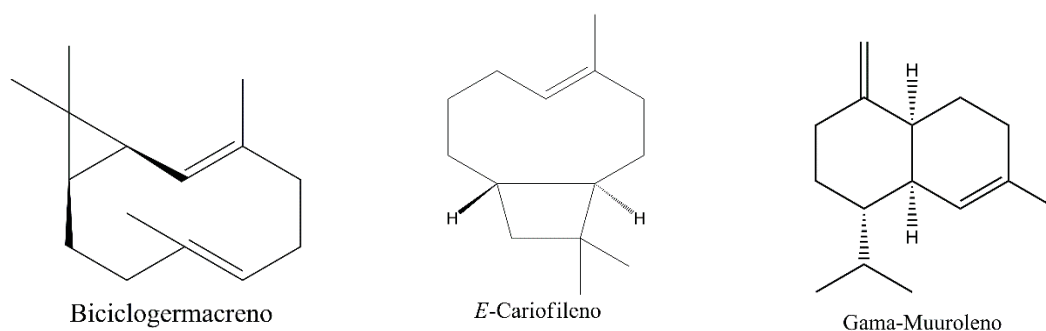


Tabela 6. Principais constituintes identificados nos óleos essenciais das folhas frescas de *Piper umbellatum* nas quatro estações do ano.

Constituintes	I. A. ¹	I. A. ²	Inverno (%) ³	Primavera (%) ³	Verão (%) ³	Outono (%) ³
δ -Elemeno	1335	1338	4,02 \pm 0,61	4,10 \pm 0,29	3,00 \pm 0,39	2,85 \pm 0,54
α -Ilangeno	1373	1376	1,01 \pm 0,19	0,98 \pm 0,09	1,28 \pm 0,05	1,27 \pm 0,09
(<i>E</i>)-Cariofileno	1417	1419	10,16 \pm 0,06	10,17 \pm 0,03	10,34 \pm 0,41	10,49 \pm 1,52
γ -Muuroleno	1478	1482	64,65 \pm 1,71	64,42 \pm 0,80	70,46 \pm 1,02	69,98 \pm 2,47
Biciclogermacreno	1500	1497	10,58 \pm 0,97	10,70 \pm 0,46	11,29 \pm 0,99	11,63 \pm 1,36
δ -Amorfeno	1511	1516	2,87 \pm 0,20	2,85 \pm 0,09	1,08 \pm 0,24	1,16 \pm 0,33
δ -Cadineno	1522	1525	4,02 \pm 0,35	3,98 \pm 0,17	2,55 \pm 0,22	2,61 \pm 0,82
Total			97,31	97,20	100,00	100,00
Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos						
α -Cadinol	1652	1656	2,69 \pm 0,81	2,80 \pm 0,38	* \pm *	* \pm *
Total			2,69	2,80	0,00	0,00
Sesquiterpenos oxigenados						

¹ - Índice aritmético da literatura (ADAMS, 2017).

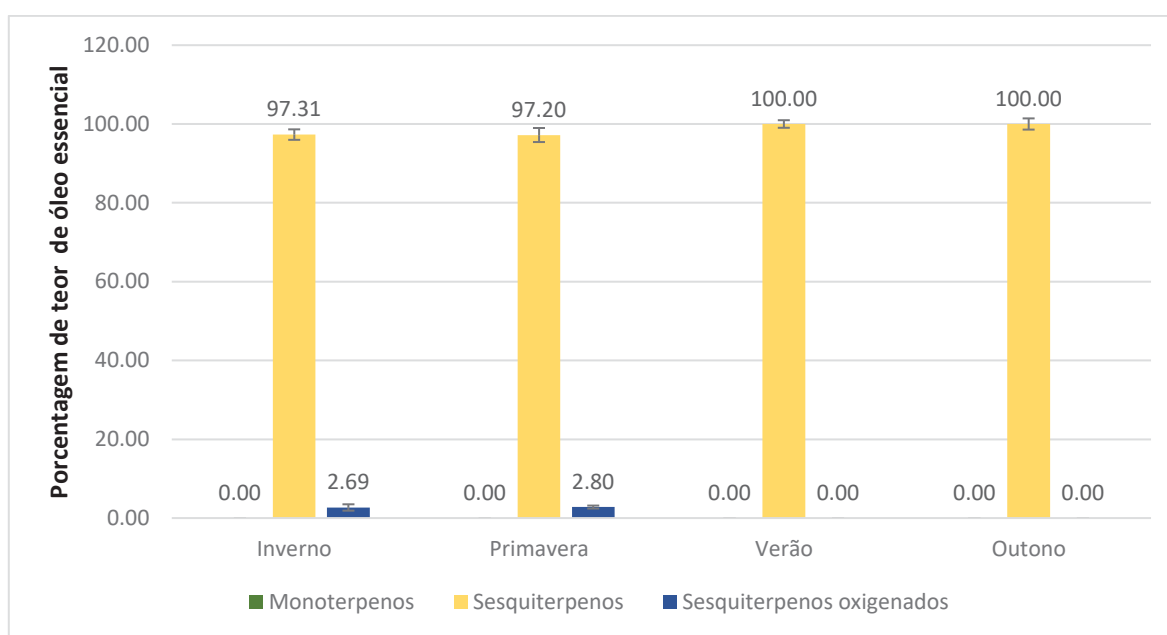
² - Índice aritmético calculado

³ - Média Aritmética das análises em triplicata com desvio padrão.

* - Não detectado

Pela Tabela 6 e pelo Gráfico 7, pode se observar que as quatro estações são muito semelhantes, tanto em relação à classe dos compostos, predomínio dos sesquiterpenos, como em relação aos compostos majoritários, que são: γ -muuroleno, biciclogermacreno e (*E*)-cariofileno. O único representante dos sesquiterpenos oxigenados é o α -cadinol, em baixa concentração e presente apenas nas estações do inverno e primavera.

Gráfico 7. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas frescas de *Piper umbellatum* em relação as estações do ano.



Mattana (2009) estudou os óleos essenciais das folhas frescas e secas de *P. umbellatum* coletadas em quatro cidades diferentes no interior de São Paulo (Piquete, Jundiaí, Iporanga e Barra do Turvo).

Na cidade de Piquete, os compostos majoritários foram (*E*)-nerolidol (18%), germacreno D (16%), (*E*)-cariofileno (14%) e α -selineno (8%), destes o único presente no nosso trabalho foi (*E*)-cariofileno com teor de 10%. Para a cidade de Jundiaí, além dos mesmos majoritários observados na cidade Piquete, observou-se o δ -cadineno (7%) com teores maiores comparando com nosso estudo (3%).

Analisando os óleos essenciais das folhas secas de *P. umbellatum*, foi detectado 8 compostos com 97% do óleo total identificado e os majoritários encontrados foram γ -muuroleno (66%), biciclogermacreno (11%) e (*E*)-cariofileno (10%) (Figura 14), diferindo apenas em relação as folhas frescas pela presença do α -cadinol em todas as estações do ano (em torno de 3%). A classe predominante foi a dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos (97%) (Tabela 7).

Tabela 7. Principais constituintes identificados nos óleos essenciais das folhas secas de *Piper umbellatum* nas quatro estações do ano.

Constituintes	I. A. ¹	I. A. ²	Inverno (%) ³	Primavera (%) ³	Verão (%) ³	Outono (%) ³
δ-Elemeno	1335	1338	3,53 ± 0,23	3,59 ± 0,26	3,44 ± 0,24	3,44 ± 0,45
α-Ilango	1373	1376	1,11 ± 0,03	1,14 ± 0,15	1,07 ± 0,12	1,12 ± 0,11
(E)-Cariofileno	1417	1419	10,07 ± 0,19	10,26 ± 0,16	9,82 ± 0,24	10,16 ± 0,63
γ-Muuroleno	1478	1482	66,38 ± 0,36	65,29 ± 0,17	67,04 ± 1,01	66,31 ± 0,47
Biclogermacreno	1500	1497	10,80 ± 0,33	10,96 ± 0,20	10,59 ± 0,48	10,79 ± 0,46
δ-Amorfeno	1511	1516	1,98 ± 0,28	1,99 ± 0,22	1,96 ± 0,36	2,04 ± 0,38
δ-Cadineno	1522	1525	3,24 ± 0,11	3,30 ± 0,07	3,17 ± 0,16	3,34 ± 0,54
Total			97,12	96,52	97,10	97,21
Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos						
α-Cadinol	1652	1656	2,88 ± 0,17	3,48 ± 0,14	2,90 ± 0,90	2,79 ± 0,63
Total			2,88	3,48	2,90	2,79
Sesquiterpenos oxigenados						

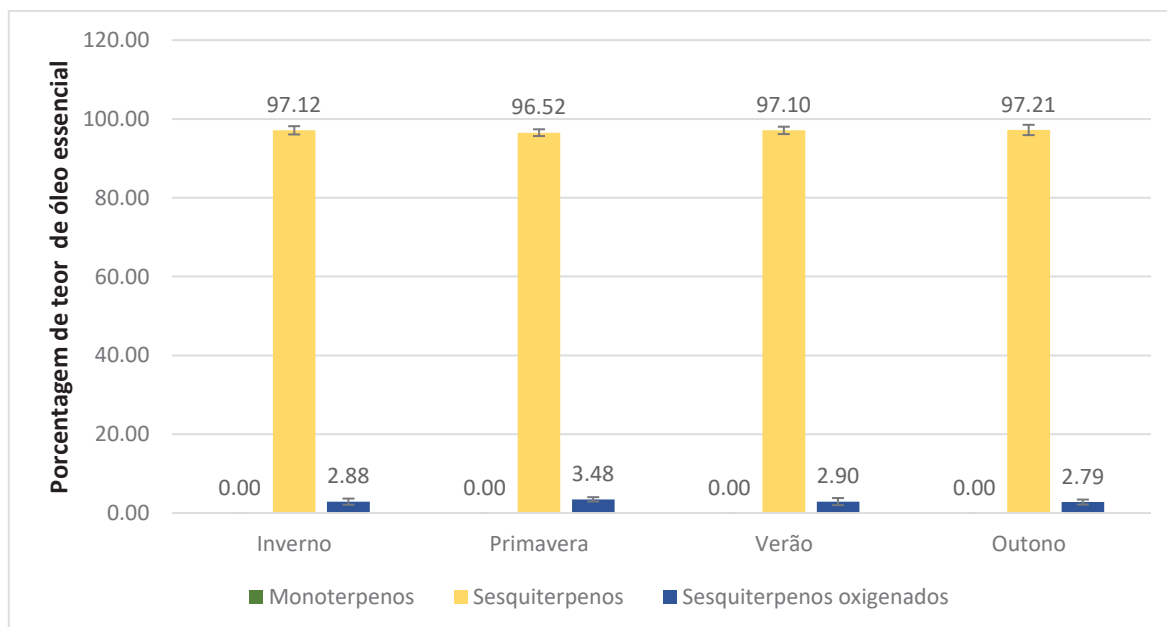
¹ - Índice aritmético da literatura (ADAMS, 2017).

² - Índice aritmético calculado

³ - Média Aritmética das análises em triplicata com desvio padrão.

Não houve alterações nas composições dos óleos essenciais entre as estações do ano (Tabela 7, Gráfico 8) como também observado para as folhas frescas.

Gráfico 8. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas secas de *Piper umbellatum* em relação às estações do ano.



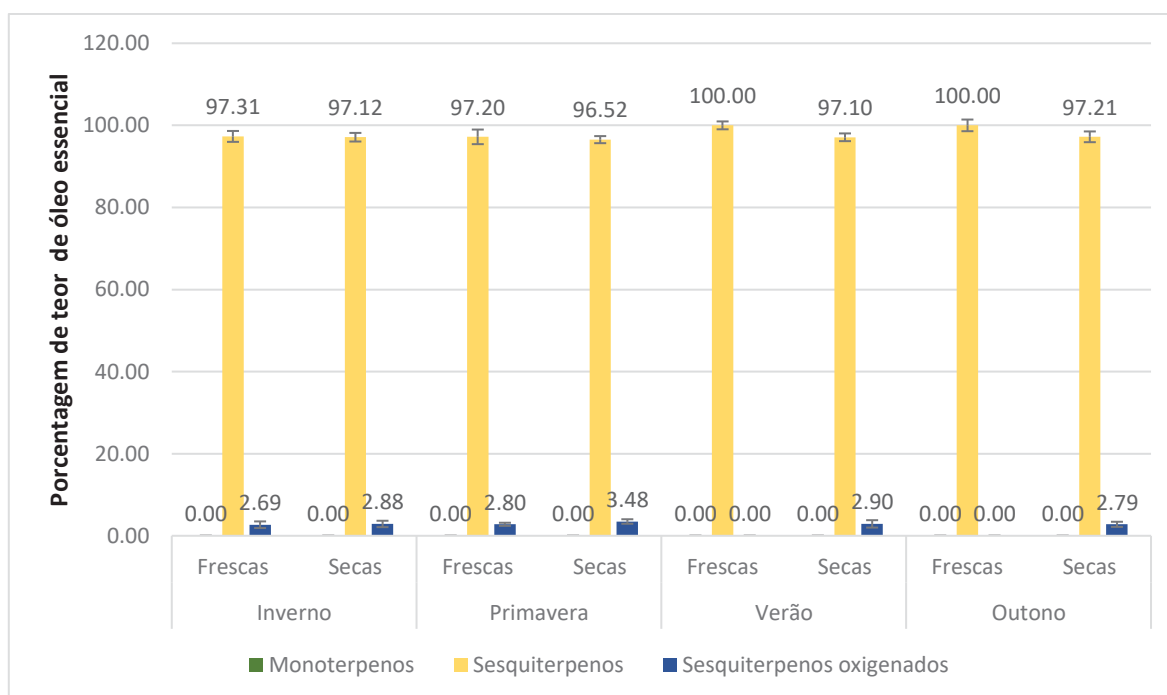
Mattana (2009) analisando os óleos essenciais das folhas secas da *P. umbellatum* da cidade de Iporanga, relatou como classe majoritária encontrada os sesquiterpenos, seguido pelos monoterpenos e, por último os sesquiterpenos oxigenados e os mesmos

compostos majoritários pesquisados nas cidades de Piquete e Jundiaí: germacreno D (16%), (*E*)-nerolidol (14%), (*E*)-cariofileno (14%), α -selineno (8%) e o δ -cadineno (0,33%) sendo este com um valor bem inferior comparando com o relacionado neste trabalho (3%).

Bergo (2010) relatou em seu estudo o composto germacreno D (38%) como majoritário para a *P. umbellatum* coletada no município de Morretes –Paraná e este composto apresentou repelência ao ácaro rajado (*Tetranychus urticae* Koch) para uso no controle de manejo de pragas (apud BOTELHO et al., 2009). Apesar do potencial do uso comercial do composto citado, o mesmo não foi encontrado neste estudo.

Comparando os dados entre as folhas frescas e secas de *P. umbellatum*, observa-se uma uniformidade entre todas as amostras de óleos essenciais (Gráfico 9).

Gráfico 9. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas frescas e secas de *Piper umbellatum* em relação às estações do ano.



O resultado da ACP para *P. umbellatum* mostrou semelhanças e diferenças entre os óleos essenciais das folhas coletadas nas quatro estações do ano e submetidas a dois métodos de secagem (frescas e secas). No gráfico de *scores* (figura 15) obtido com as médias das triplicatas, observa-se que a PC1 explica 83,86% da variância dos dados enquanto que a PC2 explica 11,64%, totalizando 95,50% da variância dos dados.

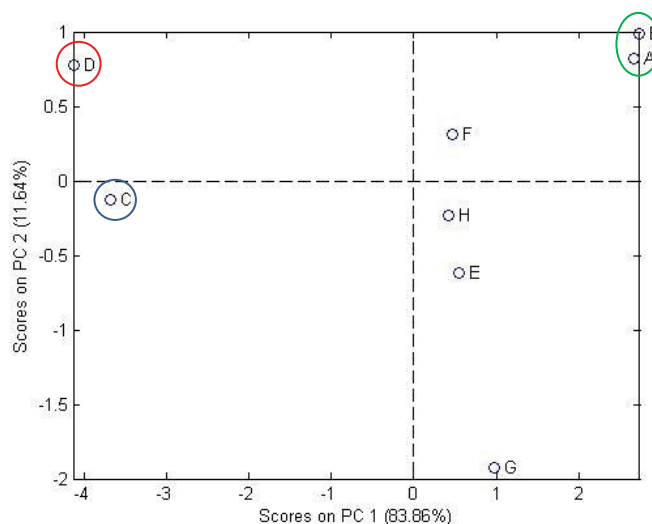


Figura 15. Scores obtidos com a média das triplicatas dos óleos essenciais das folhas frescas e secas de *Piper umbellatum* coletadas nas quatro estações do ano (**A**– Inverno fresca. **B**– Primavera fresca. **C**– Verão fresca. **D**– Outono fresca. **E**- Inverno seca. **F**– Primavera seca. **G**– Verão seca. **H**– Outono seca).

O gráfico de *scores* mostra que não existe diferença entre as amostras de folhas frescas pela PC2, enquanto para as folhas secas, não há diferença entre suas amostras pela PC1. Considerando ainda a PC1, pode-se observar na PC1 positiva, que as amostras de folhas secas se assemelham as amostras de inverno (**A**) e primavera (**B**) das folhas frescas, e que se diferenciam das estações verão (**C**) e outono (**D**) das folhas frescas, que estão no quadrante negativo da PC1.

Analisando as folhas frescas, o gráfico de *loadings* (Figura 16) mostra que os compostos **2** (α -ilangeno) e **4** (γ -muuroleno) são os responsáveis pela separação da estação do verão, enquanto o composto **3** ((*E*)-cariofileno) pela separação da estação outono e os compostos **1** (δ -elemeno), **6** (δ -amorfeno) e **7** (δ -cadineno) são os responsáveis pelo agrupamento das estações do inverno e primavera.

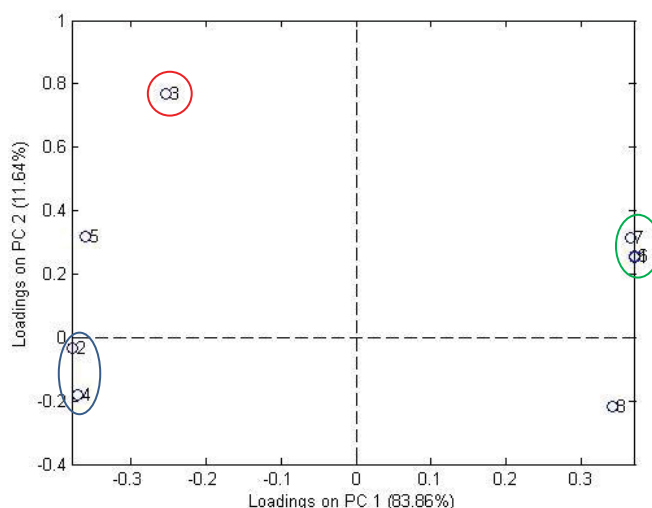


Figura 16. *Loadings* obtido com a média das triplicatas dos óleos essenciais das folhas frescas e secas de *Piper umbellatum* coletadas nas quatro estações do ano.

Para as folhas secas, observa-se que o composto **8** (α -cadinol) encontra-se em menor quantidade nas amostras de inverno (**E**), verão (**G**) e outono (**H**), enquanto que os compostos **1** (δ -elemeno), **6** (δ -amorfeno) e **7** (δ -cadineno) estão em maior quantidade nas amostras de primavera (**F**) e fazem com que essa estação fique mais próxima das amostras de folhas frescas, como observado no gráfico de *scores*.

4.4 *Piper xylosteoides* Kunth

Nas amostras de óleos essenciais das folhas frescas de *Piper xylosteoides* foram observados 27 compostos, destes foram identificados 24 constituintes, representando 88,89% do óleo, sendo os hidrocarbonetos sesquiterpênicos (38%) a classe majoritária, seguido pelos sesquiterpenos oxigenados (32%) e hidrocarbonetos monoterpênicos (30%) (Tabela 8, Gráfico 10).

No geral, os hidrocarbonetos sesquiterpênicos foram diminuindo suas porcentagens ao passar da estação de inverno para a de primavera enquanto os sesquiterpenos oxigenados aumentavam no decorrer dos períodos (Tabela 8, Gráfico 10).

Tabela 8. Principais constituintes identificados nos óleos essenciais das folhas frescas de *Piper xylosteoides* nas quatro estações do ano.

Constituintes	I. A. ¹	I. A. ²	Inverno (%) ³	Primavera (%) ³	Verão (%) ³	Outono (%) ³
α -Pino	932	932	4,99 \pm 0,11	4,51 \pm 0,34	4,79 \pm 0,21	4,58 \pm 0,03
Mirceno	988	991	1,26 \pm 0,26	2,56 \pm 0,46	* *	0,89 \pm 0,02
α -Felandreno	1002	1005	2,18 \pm 0,45	4,42 \pm 0,79	* *	1,54 \pm 0,03
β -Felandreno	1025	1028	19,56 \pm 0,24	21,03 \pm 0,05	19,87 \pm 0,29	18,88 \pm 0,06
N. I.		1267	1,93 \pm 0,31	3,50 \pm 0,54	1,55 \pm 0,07	1,96 \pm 0,04
Total			29,93	36,01	26,22	27,85
Hidrocarbonetos Monoterpênicos						
δ -Elemeno	1335	1338	8,73 \pm 0,19	7,94 \pm 0,57	3,77 \pm 0,48	6,42 \pm 0,33
β -Bourboreno	1387	1385	0,68 \pm 0,10	* *	0,82 \pm 0,05	0,56 \pm 0,03
β -Elemeno	1389	1392	1,61 \pm 0,23	* *	1,07 \pm 0,28	1,00 \pm 0,02
<i>E</i> -Cariofileno	1417	1419	6,45 \pm 0,11	5,99 \pm 0,38	8,58 \pm 0,50	6,79 \pm 0,11
Germacreno D	1484	1481	4,19 \pm 0,05	4,00 \pm 0,20	4,74 \pm 0,07	4,13 \pm 0,02
Biciclogermacreno	1500	1497	11,11 \pm 0,44	9,11 \pm 1,11	11,83 \pm 0,17	10,45 \pm 0,02
α -Muuroleno	1500	1501	0,88 \pm 0,13	* *	1,02 \pm 0,02	0,70 \pm 0,04
Premnaspirodieno	1505	1505	1,98 \pm 0,05	2,26 \pm 0,04	1,37 \pm 0,23	1,71 \pm 0,05
γ -Cadineno	1513	1515	0,94 \pm 0,13	* *	1,21 \pm 0,02	0,79 \pm 0,05
6-metil- α -Ionona	1520	1523	1,11 \pm 0,16	* *	* *	0,55 \pm 0,15
δ -Cadineno	1522	1525	2,50 \pm 0,24	2,43 \pm 0,05	2,35 \pm 0,06	2,24 \pm 0,01
Germacreno B	1559	1558	2,11 \pm 0,02	2,23 \pm 0,02	1,62 \pm 0,20	1,85 \pm 0,04
Total			42,31	33,95	38,38	37,19
Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos						
<i>E</i> -nerolidol	1561	1565	10,81 \pm 0,33	12,62 \pm 0,36	12,01 \pm 0,26	10,97 \pm 0,02
Germacreno D-4-ol	1574	1576	6,06 \pm 0,33	4,54 \pm 0,77	3,85 \pm 0,70	4,63 \pm 0,17
N.I.		1584	0,72 \pm 0,10	* *	1,28 \pm 0,13	0,73 \pm 0,06
Globulol	1590	1592	1,42 \pm 0,20	* *	1,88 \pm 0,05	1,22 \pm 0,08
Guaíol	1600	1599	* *	* *	4,71 \pm 0,73	5,81 \pm 0,33
Rosifoliol	1600	1604	* *	* *	0,67 \pm 0,21	0,92 \pm 0,05
N.I.		1615	* *	* *	0,91 \pm 0,29	1,25 \pm 0,07
<i>cis</i> -Cadin-4-en-7-ol	1635	1630	4,39 \pm 0,32	6,02 \pm 0,49	4,47 \pm 0,04	4,46 \pm 0,02
Muurolol	1640	1644	1,68 \pm 0,32	3,30 \pm 0,57	2,19 \pm 0,23	2,04 \pm 0,01
α -Cardinol	1652	1656	2,68 \pm 0,17	3,55 \pm 0,25	3,42 \pm 0,23	2,94 \pm 0,03
Total			27,76	30,04	35,39	34,96
Sesquiterpenos oxigenados						

N.I. - Não Identificado

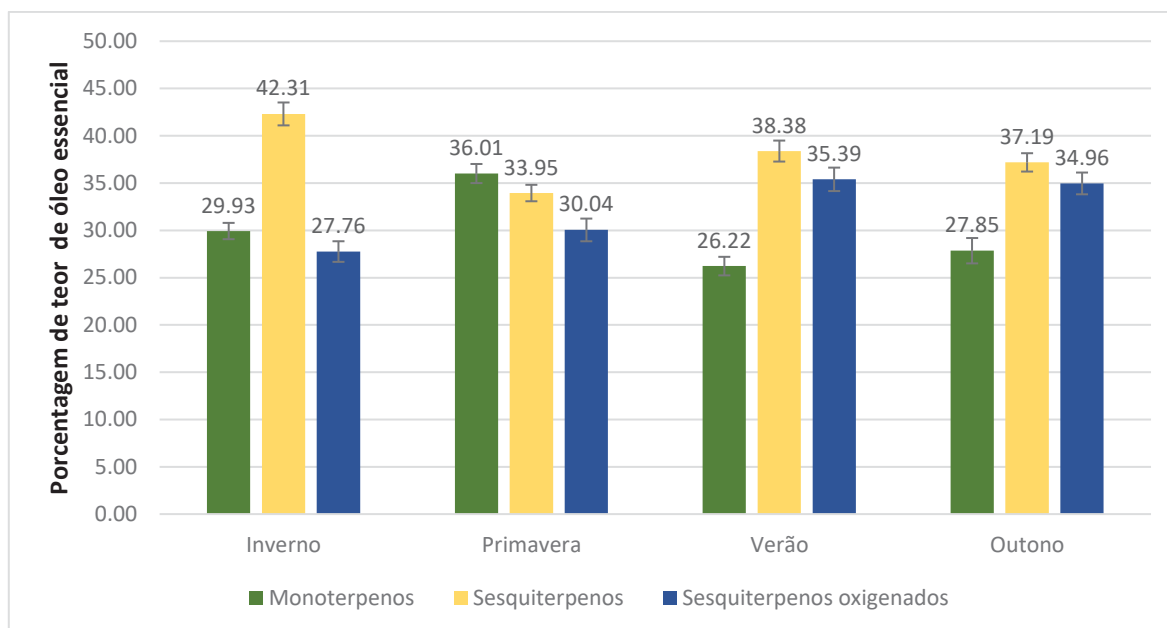
¹ - Índice aritmético da literatura (ADAMS, 2017).

² - Índice aritmético calculado

³ - Média Aritmética das análises em triplicata com desvio padrão.

* - Não detectado

Gráfico 10. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas frescas de *Piper xylosteoides* em relação às estações do ano.



Ao observar a Tabela 8, verifica-se que os compostos majoritários são comuns em todas as estações do ano e são eles: β -felandreno (20%), (*E*)-nerolidol (12%), biciclogermacreno (11%), *E*-cariofileno (7%) e δ -elemeno (7%) (Figura 17).

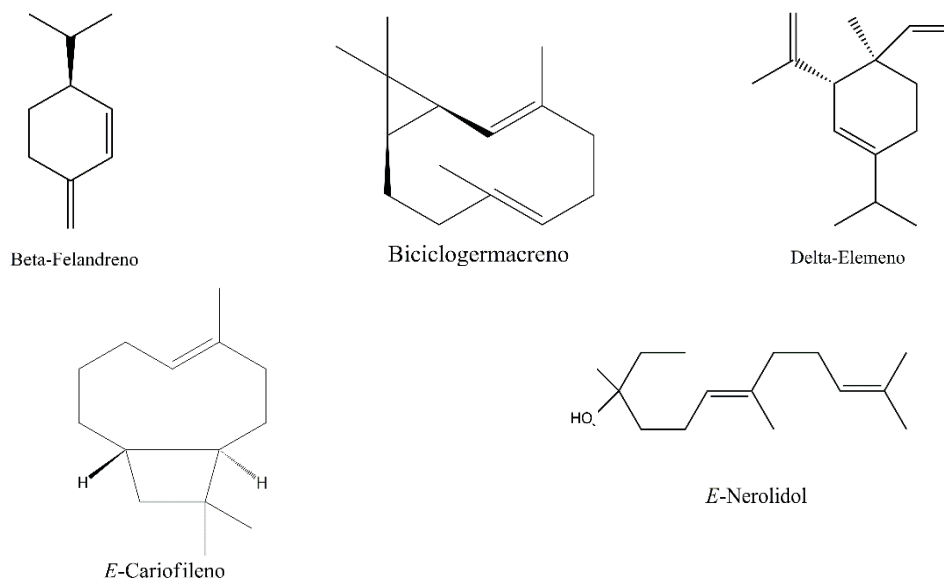


Figura 17. Compostos majoritários dos óleos essenciais das folhas frescas de *P. xylosteoides* nas quatro estações do ano.

Ferraz e colaboradores (2010) relatam uma dominância de arilpropanoides como o safrol (47,83%), eugenol (0,62%) e metileugenol (0,08%) além de hidrocarbonetos

monoterpênicos (16,98%) e sesquiterpenos (23,65%) extraídos das partes aéreas coletadas em São Francisco de Paula – Rio Grande do Sul.

Comparando com nosso trabalho, apenas os compostos (*E*)-nerolidol e (*E*)-cariofileno estão presentes no trabalho de Ferraz e colaboradores (2010) em baixa concentração e os demais compostos não foram relatados.

Ao se analisar o Gráfico 10, as estações do verão e outono apresentam perfis parecidos em relação as classes de terpenos, predominando os sesquiterpenos e os sesquiterpenos oxigenados, seguido pelos monoterpenos. Na primavera se observa diferença pouco significativa entre as três classes de terpenos, observando uma predominância dos monoterpenos, enquanto no inverno houve o predomínio dos sesquiterpenos, e sem diferença significativa das outras duas classes.

Nas extrações das folhas secas de *Piper xylosteoides* foram identificados 24 constituintes, representando 90,12% do óleo, predominando os hidrocarbonetos sesquiterpênicos (37%) quando comparado com as folhas frescas desta espécie, seguido por sesquiterpenos oxigenados (33%) e hidrocarbonetos monoterpênicos (30%) (Tabela 9, Gráfico 11).

Como no caso anterior das folhas frescas (Figura 17), os constituintes majoritários dessas amostras são β -felandreno (20%), *E*-nerolidol (11%), biciclogermacreno (11%), *E*-cariofileno (7%) e δ -elemeno (7%) presentes em todas as estações, sendo que biciclogermacreno, β -felandreno e *E*-nerolidol não tiveram alterações significativas em suas concentrações entre as quatro estações, porém o δ -elemeno verificou-se um decréscimo de aproximadamente 5% no verão (Tabela 9).

Tabela 9. Principais constituintes identificados nos óleos essenciais das folhas secas de *Piper xylosteoides* nas quatro estações do ano.

Constituintes	I. A. ¹	I. A. ²	Inverno (%) ³	Primavera (%) ³	Verão (%) ³	Outono (%) ³
α -Pineno	932	932	4,68 \pm 0,07	4,54 \pm 0,17	4,82 \pm 0,10	4,58 \pm 0,02
Mirceno	988	991	1,15 \pm 0,11	2,52 \pm 0,22	* *	0,89 \pm 0,01
α -Felandreno	1002	1005	2,00 \pm 0,20	4,35 \pm 0,38	* *	1,53 \pm 0,02
β -Felandreno	1025	1028	18,29 \pm 0,05	21,04 \pm 0,02	20,00 \pm 0,09	18,87 \pm 0,04
N. I.		1267	1,78 \pm 0,14	3,45 \pm 0,26	1,56 \pm 0,03	1,95 \pm 0,02
Total			27,91	35,89	26,39	27,82
Hidrocarbonetos Monoterpênicos						
δ -Elemeno	1335	1338	8,19 \pm 0,11	7,99 \pm 0,28	3,87 \pm 0,91	6,37 \pm 0,19
β -Bourboreno	1387	1385	0,65 \pm 0,05	* *	0,88 \pm 0,08	0,56 \pm 0,02
β -Elemeno	1389	1392	1,53 \pm 0,11	* *	1,07 \pm 0,14	1,00 \pm 0,01
<i>E</i> -Cariofileno	1417	1419	6,05 \pm 0,07	6,02 \pm 0,18	8,64 \pm 0,27	6,81 \pm 0,07
Germacreno D	1484	1481	3,92 \pm 0,03	4,02 \pm 0,10	4,78 \pm 0,04	4,13 \pm 0,01
Biciclogermacreno	1500	1497	10,44 \pm 0,23	9,21 \pm 0,54	11,91 \pm 0,06	10,45 \pm 0,01
α -Muuroleno	1500	1501	0,84 \pm 0,06	* *	0,93 \pm 0,16	0,71 \pm 0,02
Premnaspirodieno	1505	1505	1,85 \pm 0,02	2,25 \pm 0,02	1,38 \pm 0,11	1,70 \pm 0,03
γ -Cadineno	1513	1515	0,90 \pm 0,06	* *	1,27 \pm 0,09	0,80 \pm 0,03
6-metil- α -Ionona	1520	1523	1,06 \pm 0,07	* *	* *	0,52 \pm 0,09
δ -Cadineno	1522	1525	2,19 \pm 0,04	2,43 \pm 0,02	2,36 \pm 0,02	2,24 \pm 0,01
Germacreno B	1559	1558	1,99 \pm 0,03	2,23 \pm 0,01	1,63 \pm 0,10	1,84 \pm 0,02
Total			39,60	34,15	38,71	37,14
Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos						
<i>E</i> -Nerolidol	1561	1565	10,09 \pm 0,12	12,59 \pm 0,17	12,09 \pm 0,15	10,97 \pm 0,01
Germacreno D-4-ol	1574	1576	5,70 \pm 0,16	4,61 \pm 0,37	3,62 \pm 0,51	4,60 \pm 0,10
N. I.		1584	0,68 \pm 0,05	* *	1,29 \pm 0,07	0,74 \pm 0,03
Globulol	1576	1592	1,35 \pm 0,10	* *	1,90 \pm 0,03	1,23 \pm 0,05
Guaiol	1577	1606	4,78 \pm 0,13	* *	4,26 \pm 0,69	5,87 \pm 0,19
Rosifoliol	1578	1610	0,76 \pm 0,02	* *	0,68 \pm 0,11	0,93 \pm 0,03
N. I.		1614	1,03 \pm 0,03	* *	0,91 \pm 0,15	1,26 \pm 0,04
cis-Cadin-4-en-7-ol	1635	1630	4,08 \pm 0,13	5,98 \pm 0,24	4,50 \pm 0,02	4,45 \pm 0,01
Muurolol	1640	1644	1,54 \pm 0,14	3,25 \pm 0,28	2,21 \pm 0,12	2,04 \pm 0,01
α -Cardinol	1652	1656	2,49 \pm 0,07	3,53 \pm 0,12	3,44 \pm 0,12	2,95 \pm 0,02
Total			32,49	29,97	34,90	35,04
Sesquiterpenos oxigenados						

N.I. - Não identificado

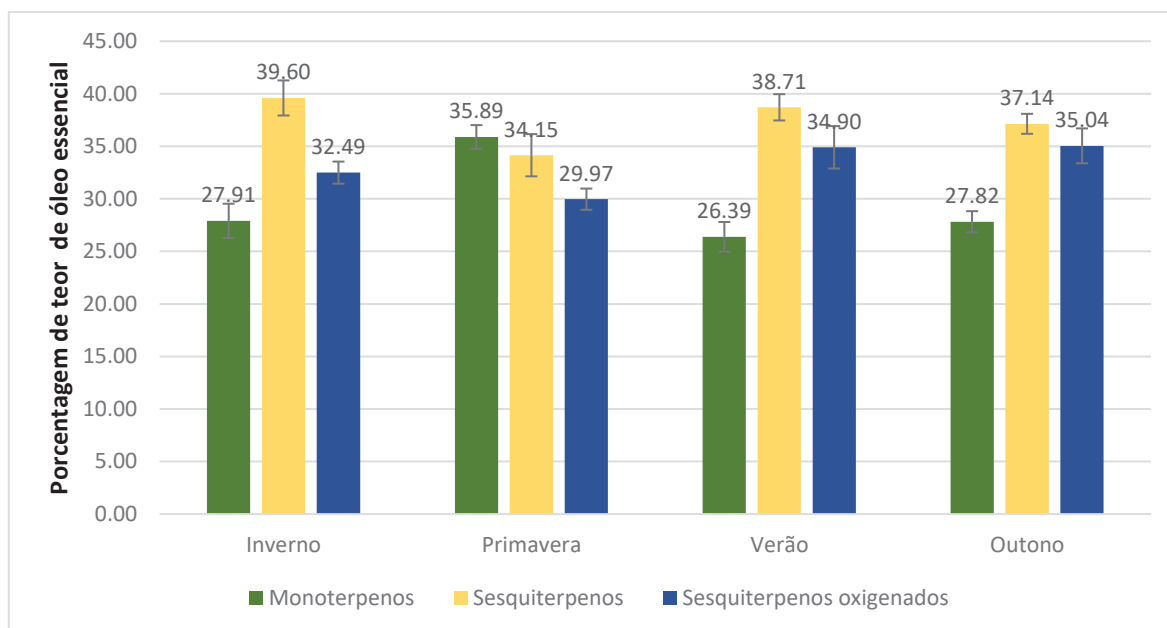
¹ - Índice aritmético da literatura (ADAMS, 2017).

² - Índice aritmético calculado

³ - Média Aritmética das análises em triplicata com desvio padrão.

* - Não detectado

Gráfico 11. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas secas de *Piper xylosteoides* em relação às estações do ano.



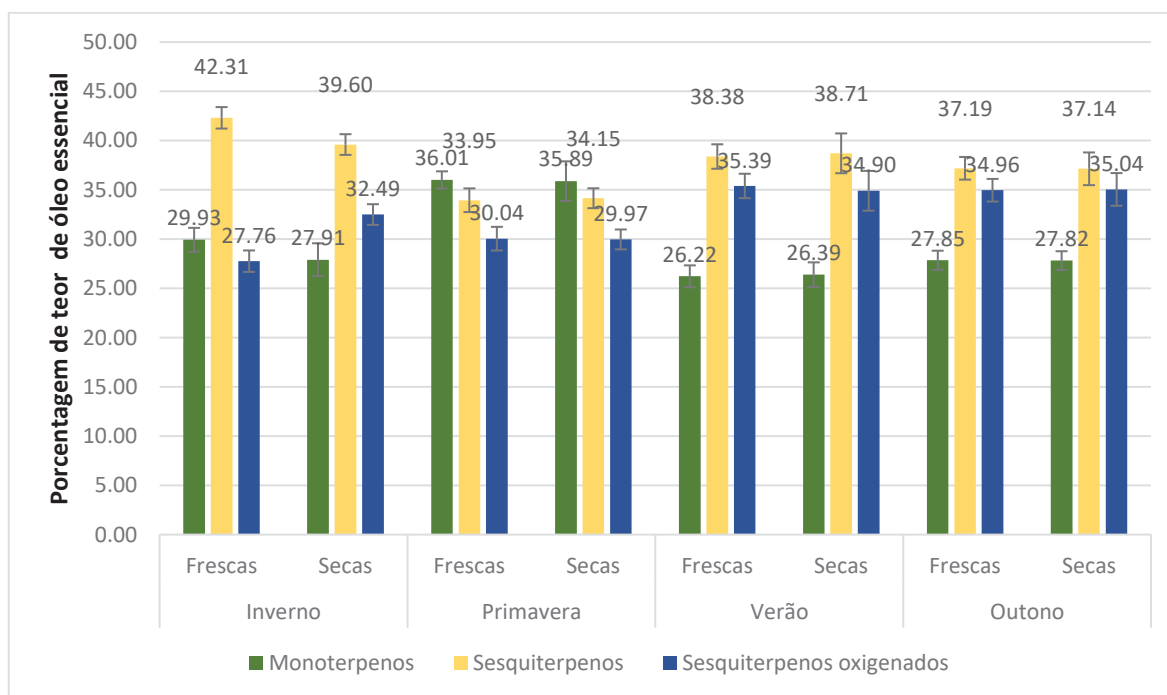
Comparando os gráficos 10 e 11, referentes as classes dos terpenos presentes nos óleos essenciais das folhas frescas e secas, respectivamente, observa-se que são gráficos quase sobreponíveis, demonstrando grande similaridade entre esses óleos. Os resultados apresentados na pesquisa de Dognini e colaboradores (2012) sobre a espécie *P. xylosteoides* (folhas secas) teve onze compostos identificados (98,9% do total do óleo) consistindo, para a cidade de Orleans-SC, em arilpropanoídes (84%), hidrocarbonetos monoterpênicos (11%) e hidrocarbonetos sesquiterpênicos (4%) sendo o majoritário o safrol (84%) seguido por α -pineno (15%).

Potzernheim e colaboradores (2012) identificaram 18 constituintes sendo 99,5% do total do óleo (para folhas secas) e os majoritários são: mirceno (31%), γ -terpineno (26%), *p*-cimeno (12%) e α -terpineno (11%). As porcentagens das classes observadas foram: monoterpenos (67%), monoterpenos oxigenados (11%), sesquiterpenos (17%) e sesquiterpenos oxigenados (6%). As amostras foram coletadas na Fazenda Sucupira (EMBRAPA), situada na cidade de Brasília (DF).

O composto α -felandreno (3,47%) foi relatado por Potzernheim et al. (2006^a) tendo um teor próximo com o observado nesta pesquisa, enquanto o mirceno (30%) é o composto majoritário no trabalho da literatura e neste trabalho apresenta um teor menor (1,55%). Em ambos os trabalhos da literatura, nenhum dos compostos majoritários coincide com os identificados nesta pesquisa, podendo ser justificado a diferentes regiões de coleta que podem resultar em diferenças na composição.

Comparando as classes de compostos dos óleos essenciais entre as folhas frescas e secas de *P. xylosteoides*, pode-se observar que, nas estações primavera, verão e outono, são praticamente superponíveis os teores das classes de terpenos. No inverno, observa-se uma pequena diferença nos teores dos monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados entre as folhas secas e frescas, mas estão dentro do desvio padrão representado no gráfico, não representando uma diferença significativa (Gráfico 12).

Gráfico 12. Comparativo das classes de terpenos identificadas nos óleos essenciais das folhas frescas e secas de *Piper xylosteoides* em relação as estações do ano.



A figura 18 apresenta o gráfico de *scores* obtido com as médias das triplicatas dos óleos essenciais de *P. xylosteoides*, observa-se que a PC1 explica 63,00% da variância dos dados enquanto que a PC2 explica 24,58%, totalizando 87,58% da variância dos dados.

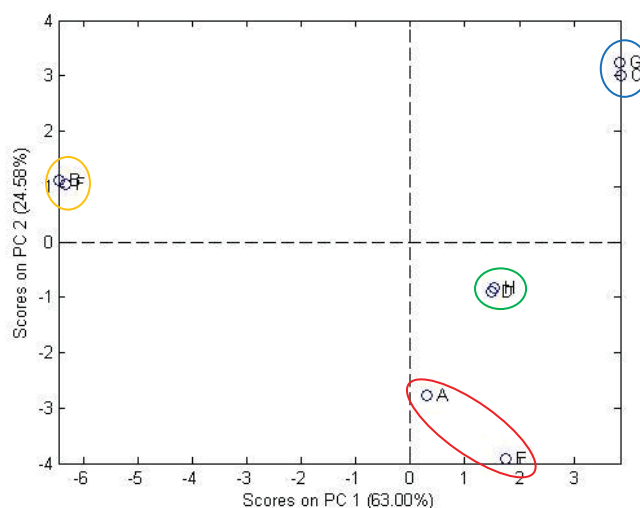


Figura 18. Scores obtidos com as médias dos óleos essenciais das folhas frescas e secas de *Piper xylosteoides* coletadas nas quatro estações do ano (A– Inverno fresca. B– Primavera fresca. C– Verão fresca. D– Outono fresca. E- Inverno seca. F– Primavera seca. G– Verão seca. H– Outono seca).

O gráfico de *scores* para *P. xylosteoides* revela uma característica bem diferente das encontradas para as outras espécies estudadas nesse trabalho, nota-se que ocorrem agrupamentos entre as amostras de folhas coletadas nas mesmas estações do ano, o que resulta na mistura entre folhas frescas e secas.

Verifica-se que existe semelhanças entre amostras de folhas frescas e secas pela PC1e pela PC2, sendo que tanto as amostras de folhas frescas quanto as amostras de folhas secas das estações inverno (A e E), verão (C e G) e outono (D e H)se encontram no quadrante positivo da PC1 enquanto que as amostras de folhas frescas e secas da estação primavera (B e F)se encontram no quadrante negativo dessa PC.

Pela PC2 também é possível observar semelhanças entre amostras frescas e secas, sendo que as estações primavera (B e F) e verão (C e G) se encontram no quadrante positivo e as estações inverno (A e E) e outono (D e H) se encontram no quadrante negativo.

O gráfico de *loadings* (Figura 19) mostra que o composto 15 (6-metil- α -ionona), está em maior quantidade nas amostras de inverno, enquanto que os compostos 4 (β -felandreno), 5 (Não Identificado), 18 ((E)-nerolidol), 25 (*cis*-cadin-4-en-7-ol), 26 (muurolol) e 27 (α -cadinol) estão em maior quantidade nas amostras de primavera, os compostos 9 ((E)-cariofileno) e 10 (germacreno D) estão em maior quantidade nas estações verão e os compostos 22 (guaiol), 23 (rosifoliol) e 24 (Não Identificado) estão em maior quantidade nas estações do outono.

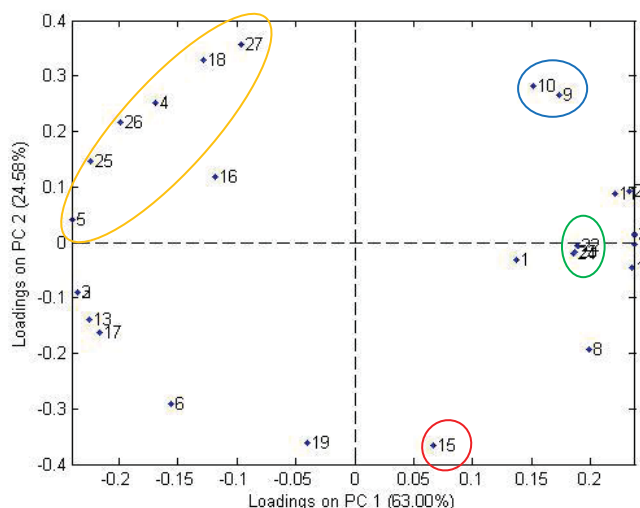


Figura 19. Loadings obtido com a média das triplicatas dos óleos essenciais das folhas frescas e secas de *Piper xylosteoides* coletadas nas quatro estações do ano.

4.5. Atividade antimicrobiana

Foram realizadas as atividades antimicrobianas para sete microrganismos (*Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus epidermidis*) com os óleos essenciais das quatro espécies trabalhadas (*P. caldense*, *P. solmsianum*, *P. umbellatum* e *P. xylosteoides*).

As técnicas utilizadas foram a Concentração Mínima Inibitória (CMI), que é a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do microrganismo (Tabela 10), e, também, a Concentração Mínima Bactericida (CMB), concentração mínima responsável pela morte de pelo menos 99,9% dos inócuos iniciais (Tabela 11). Foram avaliadas as atividades de até 2,0 mg mL⁻¹ e para os valores acima deste, os óleos foram considerados inativos.

Na pesquisa de Aligiannis e colaboradores, em 2001, classificou as atividades antimicrobianas de óleos essenciais como fortes quando o CMI for de até 0,5 mg mL⁻¹, como moderadas quando o CMI se encontra entre 0,6 e 1,5 mg mL⁻¹ e como fracas quando o CMI for maior que 1,6 mg mL⁻¹.

Tabela 10. Atividades antimicrobianas (concentração mínima inibitória - CMI) dos óleos essenciais das quatro espécies de *Piper*.

Amostra		Microrganismos (mg mL ⁻¹)			
Espécie	Estação	<i>C. albicans</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
<i>P. caldense</i>	Inverno	*	0,25	0,50	*
	Primavera	*	0,25	0,50	2,00
	Verão	*	0,25	0,50	*
	Outono	*	0,50	0,50	*
<i>P. solmsianum</i>	Inverno	*	0,25	0,50	2,00
	Primavera	*	0,25	0,50	1,00
	Verão	*	0,25	0,50	2,00
	Outono	*	0,25	1,00	2,00
<i>P. umbellatum</i>	Inverno	*	0,50	1,00	2,00
	Primavera	*	0,50	0,50	2,00
	Verão	*	1,00	1,00	*
	Outono	*	1,00	1,00	*
<i>P. xylosteoides</i>	Inverno	2,00	0,50	*	*
	Primavera	2,00	0,50	*	*
	Verão	2,00	1,00	*	*
	Outono	2,00	0,50	*	*
Referência ¹		0,002	0,004	0,008	0,004

¹ - Antimicrobianos de referência: nistatina para *C. albicans* e cloranfenicol para as bactérias.

* - CMI > 2,0 mg mL⁻¹.

Tabela 11. Atividades antimicrobianas (concentração mínima bactericida - CMB) dos óleos essenciais das quatro espécies de *Piper*.

Amostra		Microrganismos		
Espécie	Estação	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
<i>P. caldense</i>	Inverno	0,25	1,00	*
	Primavera	0,25	0,50	2,00
	Verão	0,25	1,00	*
	Outono	1,00	*	*
<i>P. solmsianum</i>	Inverno	0,25	*	*
	Primavera	0,25	2,00	2,00
	Verão	2,00	1,00	2,00
	Outono	2,00	*	*
<i>P. umbellatum</i>	Inverno	0,50	*	*
	Primavera	0,50	*	*
	Verão	2,00	*	*
	Outono	0,50	*	*
<i>P. xylosteoides</i>	Inverno	0,50	*	*
	Primavera	0,50	*	*
	Verão	1,00	*	*
	Outono	*	*	*

Na bactéria Gram-positiva *B. subtilis*, houve inibição por todos os óleos das espécies *P. caldense*, *P. solmsianum*, *P. umbellatum*. Os óleos das quatro estações da *P. caldense* e *P. solmsianum* inibiram fortemente o microrganismo (CMI entre 0,25 mg mL⁻¹ e 0,50 mg mL⁻¹), enquanto que as espécies *P. umbellatum* e *P. xylosteoides* inibiram moderadamente o microrganismo (CMI entre 0,50 mg mL⁻¹ e 1,00 mg mL⁻¹).

Em relação à bactéria Gram-positiva *S. aureus*, houve inibição por todos os óleos das espécies *P. caldense*, *P. solmsianum*, *P. umbellatum*, já para a *P. xylosteoides* não houve inibição. Os óleos das espécies que inibiram tiveram atividade moderada para o microrganismo (CMI entre 0,50 mg mL⁻¹ e 1,00 mg mL⁻¹). Justen (2007), relatou que o extrato bruto da espécie *P. caldense* foi ativo para *S. aureus* (CMI de 0,39%), Cordova e colaboradores (2010) observaram atividades nos extratos etanólicos brutos obtidos das folhas e do caule da *P. caldense*. Campos e colaboradores (2005) estudou o potencial antimicrobiano da *P. solmsianum* e relatou inibição para a bactéria acima de CMI 0,10 mg mL⁻¹ (CORDOVA et al., 2010; JUSTEN, 2007; CAMPOS, 2006).

Para a bactéria Gram-negativa *E. coli*, apenas os óleos de *P. caldense* (estação primavera), *P. solmsianum* (todas as estações) e *P. umbellatum* (estações inverno e primavera) apresentaram fraca inibição (CMI entre 1,00 mg mL⁻¹ e 2,00 mg mL⁻¹). Dognini et al. (2012) relatou atividades do óleo essencial da *P. xylosteoides* para as bactérias Gram-positiva *S. aureus* e Gram-negativa *E. coli*. Lobato e colaboradores (1989) por sua vez, observou uma inatividade para a *E. coli*, porém atividade positiva para a *S. aureus* (DOGNINI et al., 2012; LOBATO et al., 1989).

As bactérias Gram-negativa *S. choleraesuis*, *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* não foram inibidas pelos óleos essenciais testados.

Para o fungo *C. albicans*, verificou-se que os óleos essenciais das espécies de *Piper* não inibiram o microrganismo, exceto para *P. xylosteoides* nota-se uma inibição fraca (CMI = 2,00 mg mL⁻¹).

Para as atividades CMB, a bactéria Gram-positiva *B. subtilis* foi inibida pelas amostras de óleos essenciais das espécies *P. caldense*, *P. solmsianum*, *P. umbellatum* e *P. xylosteoides*, tendo forte inibição (CMB entre 0,25 mg mL⁻¹ e 0,50 mg mL⁻¹) para a *P. caldense* nas estações de inverno, primavera e verão, para a *P. solmsianum* inverno e primavera, para a *P. umbellatum* inverno, primavera e outono e para a *P. xylosteoides* inverno e primavera.

As espécies *P. caldense* na estação outono, *P. solmsianum* no verão e outono, *P. umbellatum* no verão e *P. xylosteoides* também no verão apresentaram inibição fraca (CMI entre 1,00 mg mL⁻¹ e 2,00 mg mL⁻¹).

Para a bactéria Gram-positiva *S. aureus* apenas as espécies *P. caldense* (inverno, primavera e verão) e *P. solmsianum* (primavera e verão) tiveram atividades moderadas e fraca.

Em estudos como de Swamy, Akhtar, Sinniah (2016) e Chouhan, Sharma, Guleria (2017) verifica-se que as atividades dos óleos essenciais dependem dos seus compostos majoritários, sendo os constituintes nas formas oxigenadas mais bioativos.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os constituintes dos óleos essenciais das folhas secas e frescas de *P. caldense*, *P. solmsianum*, *P. umbellatum* e *P. xylosteoides* foram identificados nas quatro estações do ano (inverno, primavera, verão e outono), apresentando como classes predominantes as dos monoterpenos, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados.

Observa-se que os compostos biciclogermacreno, *E*-cariofileno foram encontrados nas quatro espécies estudadas como majoritários, já δ -cadineno, germacreno D e α -pineno aparecem apenas na *P. caldense* e *P. solmsianum*.

Para *P. umbellatum* verifica-se que o total de compostos é baixo comparado às demais espécies deste trabalho, além de não apresentar monoterpenos em sua composição e nas estações do verão e outono também não aparece o sesquiterpeno oxigenado α -cadinol. Tem uma semelhança entre as estações de inverno e primavera para as folhas frescas e diferenciam pela composição das estações verão e outono.

Para a espécie *P. xylosteoides*, para cada estação verifica-se que os valores dos compostos encontrados são próximos em relação às folhas frescas e secas.

Através das análises de ACP de cada espécie estudada, pode-se observar que existem particularidades em cada extração, sendo que os compostos majoritários encontrados em praticamente todas as espécies foram biciclogermacreno, *E*-cariofileno, δ -cadineno, germacreno D, γ -muuroleno e α -pineno, sendo que já é conhecido que os compostos biciclogermacreno e germacreno D possuem atividades antimicrobianas e inseticidas (CALO, 2015).

Observa-se pelas atividades antimicrobianas CMI e CMB que as espécies de *Piper* estudadas nesta pesquisa são promissoras para pesquisas mais concentradas nas inibições, tendo uma importante aplicabilidade em vários ramos da indústria, pois os óleos essenciais das espécies *P. caldense*, *P. solmsianum*, *P. umbellatum* e *P. xylosteoides* possuem atividades contra as bactérias Gram-positiva *B. subtilis* e *S. aureus* e para a Gram-negativa *E. coli*.

Estudos como este sobre a determinação da composição química dos óleos e suas relações com a sazonalidade são muito importantes para futuras utilizações para fins comerciais.

6. REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**; 4th ed. Allured Publishing Corp.: Carol Stream, Illinois. viii, 2017.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.
- ANDRADE, E. H. A.; ALVES, C. N.; GUIMARÃES, E. F.; CARREIRA, L. M. M.; MAIA, J. G. S. Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* L.C. Rich. **Biochemistry Systematics and Ecology**. 39: 669-675. 2011.
- ARAÚJO, M. J. C.; **Potencial acaricida de óleos essenciais de espécies do gênero *Piper* sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)**. Dissertação de mestrado. 84 p. Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2011.
- BANDONI, A. L. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores. Vitória: EDUFES, 2008.
- BERGO, C. L.; **Estudos agronômicos e fitoquímicos de *Piper hispidinervum* C.DC. e *Piper aduncum* L. para produção de safrol e dilapiol**. Tese de doutorado. Curitiba. Universidade Federal do Paraná. 2010.
- BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C.; **Plantas aromáticas do cultivo a produção de óleos essenciais**. 1 ed. Curitiba: Layer Graf. 2009.
- CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. **Essential oils as antimicrobials in food systems – A review**. *Jornal Elsevier – Food Control*, v. 54, p. 111-119, 2015.
- CAMPOS, M. P.; FILHO, V. C.; SILVA, R. Z.; YUNES, R. A.; ZACCHINO, S.; JUAREZ, S.; CRUZ, R. C. B.; CRUZ, A. B.; **Evaluation of Antifungal Activity of *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae)**. *Biol. Pharm. Bull.* 28 (8) 1527 – 1530, 2005.
- CARDEAL, Z. L.; MARRIOTT, P. J.; Comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry analysis and comparison of volatile organic compounds in Brazilian cachaça and selected spirits. **Jornal Elsevier – Food Chemistry**. V. 112, p. 747-755, 2009.
- CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. Piracicaba. Editora Agronômica Ceres, 2005. 650 p.
- CAVALEIRO, C.; SANGUEIRO, L. R.; CUNHA, A. P. da; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; BIGHELLI, A.; CASANOVA, J. Composition and variability of the essential oils of the leaves and berries from *Juniperus navicularis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 193-201, 2003.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils – Present Status and Future Perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 58, 21 p., 2017.

CORDOVA, S. M.; BENFATTI, C. S.; MAGINA, M. D. A.; GUEDES, A. CORDOVA, C. M. M. Análise da atividade antimicrobiana de extratos isolados de plantas nativas da flora brasileira frente a *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 4, p. 241-244, 2010.

DAHAM, S. S.; TABANA, Y. M.; IQBAL, M. A.; AHAMED, M. B. K.; EZZAT, M. O.; MAJID, A. S. A.; MAJID, A. M. S. A. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilariacrassna*. **Molecules**, v. 20, p. 11808-11829, 2015.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products**. 2 ed. - Londres: John Wiley & Son LTD; p. 507, 2001.

DOGNINI, J.; MENEGHETTI, E. K.; TESKE, M. N.; BEGNINI, I. M.; REBELO, R. A.; DALMARCO, E. M.; VERDI, M.; GASPER, A. L.; Antibacterial activity of high safrole contain essential oils from *Piper xylosteoides* (Kunth) Steudel. **The Jornal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 3, p. 241-244, 2012.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

DUARTE, M. C. T.; LEME, E. E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A. A.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 197-201, 2007.

FERRAZ, A. DE B. F.; BALBINO, J. M.; ZINI, C. A.; RIBEIRO, V. L. S.; BORDIGNON, S. A. L.; POSER, G. V.; Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* species. **Parasitol Res.** v. 107. p. 243-248. 2010.

GUILHERME, A. M.; **História da medicina chinesa**. Disponível em: <<http://www.medicinachinesapt.com/historia.html>>. Acesso em 21 mai. 2017.

GUIMARÃES, E.F., Carvalho-Silva, M., Monteiro, D., Medeiros, E. 2010. **Piperaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB012869>).

GUBERT, C.; BIZZO, H.; DESCHAMPS, C.; BANHUNK, I. E.; PEÑUELA, L. Y. F.; STORCK, R. C.; ROSA, G. M.; LIMA, F. Y.; **Composição do óleo essencial de *Piper caldense* C. D.C. e *Piper solmsianum* C. D.C. provenientes da mata atlântica do litoral do paraná**. 2010.

JUSTEN, M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de espécies do gênero *Piper***. 2007. 50 f. Trabalho de conclusão de curso (graduação em Farmácia). Universidade Regional de Blumenau, Blumenau - Santa Catarina, 2007.

LIMA, D. K. S.; BALLICO, L. J.; LAPA, F. R.; GONÇALVES, H. P.; SOUZA, L. M.; IACOMIN, M.; WERNER, M. F. P.; BAGGIO, C. H.; PEREIRA, I. T.; SILVA, L. M.; FACUNDO, V. A.; SANTOS, A. R. S. Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastricantulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C.DC in rodents. **Journal of Ethnopharmacology** 142: 274-282. 2012.

LOBATO, A. M.; RIBEIRO, A.; PINHEIRO, M. F. S.; MAIA, J. G. S. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais da Amazônia. **Acta Amazônica**, 19, 355–363 (1989).

LUZ, A.I.R. et al. Volatile constituents of brazilian Piperaceae, Part 5. The oils of *Pothomorphe umbellata* and *P. peltata*. **Journal of Essential Oil Research**. v. 11, n. 4, p. 479-481.1999.

LUZ, M. T. **Cultura contemporânea e medicinas alternativas: novos paradigmas em saúde no fim do século XX**. Physis, Rio de Janeiro, p.145-176, 2005.

MACHADO, B. F. M. T.; FERNANDES JR., A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Unisul– cadernos acadêmicos**, Tubarão, v. 3, n. 2, 2011.

MARTINS, A.P. et al. Essential oils from four Piper species. **Phytochemistry**. v. 49, n.7, p.2019-2023, 1998.

MASUDA, T.; INAZUMI, A.; YAMADA, Y.; PADOLINA, W. G.; KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Antimicrobial phenylpropanoids from *Piper sarmentosum*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 10, p. 3227-3228, 1991.

MATTANA, R.S.; **Produção de biomassa, teor e composição do óleo essencial e plasticidade foliar em plantas de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. cultivadas sob diferentes níveis de sombreamento**. 108p. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Horticultura. Botucatu. Universidade Estadual Paulista. 2005.

MATTANA, R. S.; **Produção de biomassa foliar, óleo essencial e 4- nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq**. Tese de doutorado. Botucatu, São Paulo. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. 2009.

MATASYOH, J. C.; WATHUTA, E. M.; KARIUKI, S. T.; CHEPKORIR, R. Chemical composition and larvicidal activity of *Piper capense* essential oil against the malaria vector, *Anopheles gambiae*. **Journal of Asia-Pacific Entomology** 14: 26-28. 2011.

MELO, R. C. de A. e. Plantas medicinais, óleos essenciais e aromas – Parte I: Definições. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n 2, mar/abr, 2005.

MESQUITA, J.M.O. et al. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, n.1, p. 6-12, 2005.

MORAES, M.S. de. **Caracterização Farmacognóstica da Droga e do Extrato Fluido de *Pothomorphe umbellata* L. Miq**. São Paulo. 112p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas/ Controle de Qualidade de Drogas e Medicamentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.1983.

MOREIRA, D. L.; SOUZA, P. O.; KAPLAN, M. A. C.; PEREIRA, N. A.; CARDOSO, G. L.; GUIMARÃES, E. F. Effect of leaf essential oil from *Piper solmsianum* C. DC. in mice behaviour. **Academia Brasileira de Ciências**, 73 (1). 2001.

NAGATA, N.; BUENO, M. I. M. S.; PERALTA-ZAMORA, P. G. Métodos matemáticos para correção de interferências espectrais e efeitos interelementos na análise quantitativa por fluorescência de raios-X. **Química Nova**, v. 24, n.4, p. 531-539, 2001.

NICARETA, C. **Óleos essenciais de *Solanum* e a interação com morcegos frugívoros**. Curitiba. 77 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Universidade Federal do Paraná. 2006.

NGASSAPA, O. D.; RUNYORO, D. K. B.; VAGIONAS, K.; GRAIKOU, K.; CHINOU, I. B. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Geniosporum rotundifolium* Briq and *Haumaniastrum villosum* (Bene) AJ Paton (Lamiaceae) Essential Oils from Tanzania. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 1, p. 107-113, 2016.

OTTO, M. **Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry**, 2ª ed. - Alemanha: Wiley – VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007.

PACHECO, F. V.; AVELAR, R. P.; ALVARENGA, I. C. A.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ALVARENGA, A. A.; PINTO, J. E. B. P. **Essential oil of Monkey-pepper (*Piper aduncum* L.) cultivated under different light environments**. Industrial Crops and Products, v. 85, p. 251-257, 2016.

PERIGO, C. V.; TORRES, R. B.; BERNACCI, L. C.; GUIMARÃES, E. F.; HABER, L. L.; FACANALI, R.; VIEIRA, M. A. R.; QUECINI, V.; MARQUES, M. O. M.; The chemical composition and antibacterial activity of eleven Piper species from distinct rainforest areas in Southeastern Brazil. **Industrial Crops and Products**. 94: 528-539. 2016.

PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Cultivo e processamento de plantas medicinais**. Lavras: UFLA, 2002. p. 47.

Piperaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12735>>. Acesso em: 08 mar 2019.

Piperi cultura. Casa do produtor rural – ESALQ / USP. Piracicaba. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/cprural/boapratica/mostra/108/pipericultura.html>>. Acesso em: 11 mar 2019.

PLANTAS DA FLORESTA ATLÂNTICA. Editores Renato Stehmann et al. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009. 515p. Disponível em: <http://www.jbrj.gov.br/publica/livros_pdf/plantas_floresta_atlantica.zip>. Acesso em: 29 mar 2019.

POTZERNHEIM, M. C. L.; BIZZO, H. R.; SILVA, P. J.; VIEIRA, R. F. Chemical characterization of essential oil constituents of four populations of *Piper aduncum* L. from Distrito Federal, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology** 42: 25-31. 2012.

POTZERNHEIM, M. C. L.; BIZZO, H. R.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; VIEIRA, R. F.; CARVALHO-CILVA, M.; GRACINDO, L. A. M. B. Chemical characterization of seven *Piper* species (Piperaceae) from Federal District, Brazil, based on volatile oil constituents. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v. 8, n. esp., p. 10-12, 2006^a.

POTZERNHEIM, M. C. L.; COSTA, A. F.; BIZZO, H. R.; SILVA, P. J.; VIEIRA, R. F. Essencial oil of *Piper xylosteoides* (Kunth) Steud. from Federal District, Brazil. **J. Essent. Oil Res.**, **18**, 523-524, 2006^b.

QUIQUI, E. M. D.; **Caracterização da flora aromática de um segmento da floresta estacional semidecidual do Paraná**. Projeto e Pesquisa. Instituto Ambiental do Paraná (IAP), p. 1-16, 2015.

RANDRIANALJAONA, J.; RAMANOELINA, P.A.R.; RASOARAHONA, J.R.E.; GAYDOUB, E.M. Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L. Essential oils from Madagascar. **Analytica Chimica Acta**, v. 545, p. 46-52, 2005.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**. v. 62, p. 250-264, 2014.

ROCHA, D. S.; SILVA, J. M.; NAVARRO, D. M. A. F.; CAMARA, C. A. G.; LIRA, C. S.; RAMOS, C. S.; **Potential Antimicrobial and Chemical Composition of Essential Oils from Piper caldense Tissues**. J. Mex. Chem. Soc. 60 (3), p. 148-151, 2016.

ROJAS, D. L. V. **Expressão sexual, polinizadores e sistema reprodutivo em Piper caldense C. DC. (PIPERACEAE) em fragmento de floresta atlântica**. 39 f. Dissertação (Mestrado em Botânica). Viçosa – MG. Universidade Federal de Viçosa. 2015.

SANTOS, T. G.; DOGNINI, J.; BEGNINI, I. M.; REBELO, R. A.; VERDI, M.; GASPER, A. L.; DALMARCO, E. M. Chemical Characterization of Essential Oils from *Drimys angustifolia* Miers (Winteraceae) and Antibacterial Activity of their Major Compounds. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 1, p. 164-170, 2013.

SANTOS, T. G.; FUKUDA, K.; KATO, M. J.; SARTORATO, A.; DUARTE, M. C. T.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; AUGUSTO, F.; MARQUES, F. A.; MAIA, B. H. L. N. S. Characterization of the essential oils of two species of Piperaceae by one- and two-dimensional chromatographic techniques with quadrupole mass spectrometric detection. **Micro Chemical Journal**. v. 115, p. 113-120, 2014.

SARTO, M. P. M.; ZANUSSO JUNIOR, G. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais. **Revista UNINGA review**. Vol. 20, n. 1, p. 98-102, 2014.

SAUTER, I. P.; ROSSA, G. E.; LUCAS, A. M.; CIBULSKI, S. P.; ROEHE, P. M.; SILVA, L. A. A.; ROTT, M. B.; VARGAS, R. M. F.; CASSEL, E.; VON POSER, G. L. Chemical Composition and amoebal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. **Industrial Crops and Products** 40: 292-295. 2012.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002.

SIANI, A. C. Óleos essenciais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, p. 38-43. Brasil. 2000.

SILVA, R. **Crescimento e teor de óleo essencial de *Aloysia triphylla* (L'Hérit) britton (Verbenaceae), em função da adubação orgânica, sazonalidade, horário de colheita e processamento pós-colheita**. 66 f. 2005. Dissertação (mestrado em Agronomia). Lavras. Universidade Federal de Lavras. 2005.

SILVA, R. Z. DA. **Estudo fitoquímico e biológico da *Piper solmsianum* C.DC. variedade solmsianum (PIPERACEAE)**. 252 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Florianópolis – SC. Universidade Federal de Santa Catarina. 2006.

SOLETTI, A. G.; **Efeitos da sazonalidade sobre a composição química, potencial antimicrobiano, citotóxico e mutagênico dos óleos essenciais e frações diclorometano e acetato de etila de *Piper amplum* e *Piper cernuum***. 183 f. Tese (doutorado em Ciências Farmacêuticas). Itajaí. Universidade do Vale do Itajaí. 2015.

SOUTO, J. R.; **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos e frações de espécies de *Piper* (piperaceae) por bioautografia [manuscrito]**. Universidade Estadual da Paraíba. 2014.

SOUZA, S. A. M.; MEIRA, M. R.; FIGUEIREDO, L. S. de; MARTINS, E. R. Óleos essenciais: Aspectos econômicos e sustentáveis. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer- Goiânia, v. 6, n. 10, 2010.

SPEROTTO, A. R. M.; MOURA, D. J.; PÉRES, V. F.; DAMASCENO, F. C.; CAMARÃO, E. B.; HENRIQUES, J. A. P.; SAFFI, J. Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. **Food and Chemical Toxicology**. In press. 2013.

STEFFENS, A. H.; **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a valor em escala laboratorial e industrial**. 71 f. 2010. Dissertação (mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Porto Alegre. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 2010.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIH, U. R. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, ID 3012462, 21 p., 2016.

TAIZ, L. ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TRANCOSO, M. D. Projeto Óleos essenciais: extração, importância e aplicações no cotidiano. **Revista Práxis**, ano V, n. 9, 2013.

VASCONCELLOS, V.; **História dos óleos essenciais**. 2017. Disponível em: <<http://shinsei.com.br/historia-dos-oleos-essenciais>>. Acesso em: 12 nov. 2018.

VIEGAS, M. C.; BASSOLI, D. G. Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, p. 2031-2034, 2007.

YAMAGUCHI, L. F.; FREITAS, G. C.; YOSHIDA, N. C.; SILVA, R. A.; GAIA, A. M.; SILVA, A. M.; SCOTTI, M. T.; EMERENCIANO, V. P.; GUIMARÃES, E. F.; FLOH, E. I. S.; COLOMBO, C. A.; SIQUEIRA W. J.; KATO M. J. **Chemometric Analysis of ESIMS and NMR Data from Piper Species**. Sociedade Brasileira de Química. v. 22, n. 12, p. 2371-2382, 2011.